

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Fytochemické studium vybraných genotypů máty**

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Jana Šišková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Sanja Ćavar Zeljković, Ph.D.</b>
Rok:	2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 13. 5. 2019

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D. za pomoc, trpělivost a odborné rady při vedení mé bakalářské práce. Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za všestrannou pomoc, kterou mi poskytl při zpracování této práce. Ráda bych poděkovala Ing. Kataríně Kaffkové, Ph.D. za cenné rady. Poděkování patří instituci VÚRV, v.v.i. za poskytnutý prostor k práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. za pomoc při překladu sloučenin.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Šišková
Název práce	Fytochemické studium vybraných genotypů máty
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	Ing. Sanja Čavar Zeljković, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Jedním z nejvýznamnějších rodů čeledi *Lamiaceae* je rod *Mentha*. Rostliny rodu *Mentha* vykazují řadu biologických vlastností, mají antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Za řadu těchto vlastností zodpovídají fenyylpropanoidy a terpenoidy obsažené v rostlinách máty. Práce se zabývá fytochemickým studiem 13 vybraných genotypů máty. Teoretická část je zaměřena na rod máty, nejvýznamnější zástupce a na obsažené sekundární metabolity, následně jsou popsány metody izolace a analýzy sekundárních metabolitů rostlin. Experimentální část práce je zaměřena na izolaci silic z genotypů máty pomocí hydrodestilace a na identifikaci a kvantifikaci jejich složek s využitím techniky GC-MS. Identifikace silic poskytla 64 sloučenin, v headspace bylo identifikováno 31 sloučenin. Majoritními složkami silic byly oxidované monoterpeny. Cíli práce byly kvantifikace fenolických sloučenin v methanolických extraktech máty, stanovení antioxidační a antityrosinasové aktivity extraktů a silic máty a porovnání genotypů na základě výsledků těchto metod. Nejvyšší množství celkových fenolů obsahoval extrakt genotypu *M. suaveolens*. Nejvyšší množství flavonolů bylo přítomné u *M. longifolia* a nejvyšší množství flavononů obsahovala *M. villosa*. Byly zjištěny významné rozdíly v antioxidační aktivitě jednotlivých genotypů. Byla prokázána korelace mezi obsahem fenolických sloučenin a antioxidační aktivitou extraktů. Inhibitory tyrosinasy jsou využívány v medicíně při léčbě hyperpigmentace. Zkoumáním extraktů i silic máty byly zjištěny signifikantní rozdíly v antityrosinasové aktivitě. Nejvyšší antityrosinasovou aktivitu měla silice *M. piperita* 'Bergamotova', jejíž majoritní složkou byl linalool, který vykazuje chelatační účinky. Nebyla prokázána závislost antityrosinasové aktivity na obsahu fenolických látek. Výsledky dokládají všestranné využití rostlin máty,

zejména v medicíně a potravinářském průmyslu. Genotyp *M. villosa* se jeví jako multifunkční, vykazoval vysoký obsah fenolických látek a jeho extrakt měl nejvyšší antioxidační aktivitu. Tento genotyp je díky svým výhodným vlastnostem výhodný z hlediska pěstitelství.

Klíčová slova	Silice, genotypy máty, terpenoidy, fenolické sloučeniny, antioxidační aktivita, inhibice enzymů
Počet stran	76
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jana Šišková
Title	Phytochemical investigation of selected <i>Mentha</i> species
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	Ing.Sanja Ćavar Zeljković, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

One of the most important genera of *Lamiaceae* family is genus *Mentha*. Plants of genus *Mentha* have many biological properties, such as antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory effects. Phenylpropanoids and terpenoids are responsible for many of those properties. The thesis is focused on a phytochemical investigation of 13 selected *Mentha* genotypes. The theoretical part focuses on genus *Mentha*, most significant species and secondary metabolites of mint, methods of isolation and analysis of plant secondary metabolites. The experimental part of the thesis is focused on isolation of essential oils from selected mint genotypes using hydrodistillation and identification and quantification of oil components using GC-MS technique. The identification of essential oils provided 64 compounds, while 31 compounds were identified in the headspace. The major compounds were classified as oxygenated monoterpenes. Part of the work is also the quantification of phenolic compounds in methanol extracts and determination of antioxidant and antityrosinase activity of essential oils and extracts. Selected genotypes were compared based on the results. The highest amount of total phenolics was found in extract of *M. suaveolens*, while the highest amount of flavonols was found in *M. longifolia*, and highest amount of flavonons in *M. villosa*. Differences between antioxidant activity of selected genotypes were significant. Correlation between the content of phenolic compounds and antioxidant activity of extracts was observed. Tyrosinase inhibitors are used in medicine for treating hyperpigmentation. Significant differences were discovered by the research of antityrosinase activity in both mint essential oils

and extracts. Highest antityrosinase activity was discovered in *M. piperita* 'Bergamotova' essential oil, which was composed of linalool, that shows chelating effects. No correlation between antityrosinase activity and phenolic content was found. The results show versatile use of *Mentha* plants, mostly in medicine and in food industry. Genotype *M. villosa* could have multifunctional use since the extract possessed high amount of phenolic compounds and it showed the highest antioxidant activity. Moreover, this species is also very convenient for breeding.

Keywords	Essential oils, <i>Mentha</i> sp., terpenoids, phenolic compounds, antioxidant activity, enzyme inhibition
Number of pages	76
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	11
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	12
2.1	Rod máty	12
2.1.1	Genotypy máty	13
2.1.1.1	Původní druhy máty	13
2.1.1.2	Máta peprná	14
2.1.1.3	Další genotypy máty	15
2.2	Sekundární metabolity rostlin	16
2.2.1	Terpenoidy a jejich syntéza	16
2.2.1.1	Skupiny terpenoidů a jejich výskyt v silici máty	19
2.2.2	Fenylpropanoidy	20
2.2.3	Alkaloidy	23
2.3	Metody izolace sekundárních metabolitů rostlin	24
2.3.1	Metody získávání silic	24
2.3.1.1.	Destilace vodní parou	24
2.3.1.1.1	Hydrodestilace	24
2.3.1.1.2	Hydrodestilace podle Clevengera	24
2.3.1.2	Enfleuráž	26
2.3.2	Metody extrakce fenylpropanoidů	26
2.3.2.1	Soxhletova extrakce	26
2.3.2.2	Extrakce ultrazvukem	27
2.3.2.3	Extrakce rozpouštědly	27
2.3.3	Metody purifikace	28
2.4	Metody charakterizace přírodních produktů	29
2.4.1	Metody analýzy terpenoidů	29
2.4.1.1	GC-FID chromatografie	29
2.4.1.2	GC-MS spektrometrie	29
2.4.1.3	Headspace analýza	31
2.4.2	Spektrofotometrické metody analýzy fenylpropanoidů	31
2.4.2.1	Stanovení celkových fenolů metodou Folin-Ciocalteu	31
2.4.2.2	Stanovení flavonolů kolorimetrickou metodou s AlCl <sub>3</sub>	32
2.4.2.3	Stanovení flavononů kolorimetrickou metodou s 2,4-DNPH	33
2.4.3	Stanovení antioxidační aktivity	34
2.4.3.1	Metoda DPPH	34
2.4.3.2	Metoda ABTS	35
2.4.3.3	Metoda ORAC	35
2.4.4	Inhibice enzymu tyrosinasy	35
2.4.4.1	Stanovení antityrosinasové aktivity	37
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	38
3.1	Materiál	38
3.1.1	Chemikálie	38
3.1.2	Biologický materiál	39
3.1.3	Přístrojové vybavení	39
3.2	Metody	40
3.2.1	Izolace silic máty	40
3.2.2	Metoda headspace	40
3.2.3	Analýza silic a headspace máty s využitím metody GC-MS a identifikace jejich složek	40



3.2.4	Příprava rostlinných extraktů	41
3.2.5	Analýza fenolických složek rostlinných extraktů	41
3.2.5.1	Stanovení celkových fenolů metodou Folin-Ciocalteu	42
3.2.5.2	Stanovení flavonolů kolorimetrickou metodou s AlCl <sub>3</sub>	42
3.2.5.3	Stanovení flavononů kolorimetrickou metodou s 2,4-DNPH	43
3.2.6	Stanovení antioxidační aktivity extraktů a silic	43
3.2.7	Stanovení antityrosinasové aktivity extraktů a silic	44
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse</b>	46
4.1	Izolace silic, identifikace a kvantifikace jejich složek	46
4.2	Kvantifikace složek headspace	52
4.3	Kvantifikace fenolických látek	56
4.3.1	Kvantifikace celkových fenolů	56
4.3.2	Kvantifikace flavonolů	57
4.3.3	Kvantifikace flavononů	58
4.4	Stanovení antioxidační aktivity extraktů a silic	61
4.5	Stanovení antityrosinasové aktivity extraktů a silic	65
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	69
<b>6</b>	<b>Literatura</b>	71
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	76

## **Cíle práce:**

1. Vypracování literární rešerše s využitím klíčových slov: silice, genotypy máty, terpenoidy, fenolické sloučeniny, antioxidační aktivita, inhibice enzymů.
2. Izolace silic z vybraných genotypů máty pomocí hydrodestilace.
3. Srovnání složení silic jednotlivých genotypů máty pomocí plynové chromatografie a kvantifikace fenolických sloučenin v rostlinných extraktech.
4. Stanovení antioxidační a antityrosinasové aktivity silic a extraktů máty.

# 1 ÚVOD

Čeleď *Lamiaceae* (Hluchavkovité) patří mezi jedny z nejvýznamnějších rostlinných čeledí komerčně využívaných v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Významným rodem této čeledi je rod *Mentha* (rod máty). Nejdůležitějšími sekundárními metabolity máty, které zodpovídají za řadu biologických účinků těchto rostlin, jsou terpenoidy a fenyylpropanoidy. Informace o počtu druhů máty nejsou jednotné, existuje široká řada genotypů máty, tedy individuálních organismů s různou genetickou konstitucí. V Evropě patří mezi nejvíce využívané druhy *Mentha piperita* (máta peprná) a *Mentha spicata* (máta klasnatá).

Aromatické rostliny máty jsou používány k izolaci silic, které jsou produkovány specifickými částmi rostliny. Silice mají lipofilní charakter a vyznačují se vysokým obsahem monoterpenů a seskviterpenů, procentuální zastoupení těchto složek je rozdílné napříč různými genotypy. Silice jsou často využívány v parfumerii, aromaterapii či tradiční medicíně. Nejčastěji je užívána silice máty peprné, jedná se o hybrid máty klasnaté a máty vodní. Rostlinám máty je přisuzována řada biologických účinků. Je udáváno, že mají antioxidační, antibakteriální a analgetické účinky. Jsou vhodné k užití jako insekticidy. Rostliny máty mají také vasodilatační účinky, využívají se jako podpora při léčbě horečky, k podpoře trávení či jako lokální anestetika. K těmto účelům jsou využívány listy máty či celé nadzemní části rostlin.

V poslední době je pozornost zaměřena na volné radikály. Tyto látky jsou schopné přeměňovat významné sloučeniny v organismu a měnit jejich funkci, hrají tak významnou roli v oxidačním stresu. Rolí antioxidantů je vychytávat tyto volné radikály a snižovat oxidační stres. Za antioxidační aktivitu rostlin máty zodpovídají především obsažené fenolické sloučeniny, jedná se zejména o fenolické kyseliny a flavonoidy. Antioxidační aktivita rostlin máty může být stanovena řadou metod, například metodami využívajícími radikály ABTS, DPPH či metodou ORAC. Zkoumány jsou také účinky máty na inhibici enzymů, z čehož vyplývá možné budoucí užití těchto bylin v průmyslu. Zejména látky s antityrosinázovou aktivitou mají široké využití v medicíně.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rod máty

Rod máty je zařazován do čeledi *Lamiaceae* (Hluchavkovité), podčeledi *Nepetoideae*, tribus *Mentheae*. Kosmopolitně rozšířená čeleď *Lamiaceae* patří do řádu *Lamiales* (Hluchavkotvaré) a zahrnuje přibližně 220 rodů a 3300 druhů (Hawryl *et al.*, 2015). Čeleď *Lamiaceae* se vyznačuje vysokým obsahem polyfenolů a je známá pro své antioxidační účinky. Mezi farmaceuticky nejvýznamnější rody čeledi *Lamiaceae* patří *Rosmarinus* (Rozmarýn), *Lavandula* (Levandule), *Melissa* (meduňka), *Thymus* (mateřídouška) a *Mentha* (Máta). Rod máty zahrnuje přibližně 25 druhů, které jsou kosmopolitně rozšířeny zejména v mírných podnebných oblastech (Celenk *et al.*, 2008). Máta je ovšem rod velmi proměnlivý a údaje o počtu druhů nejsou jednotné. Díky častým hybridizacím a vysoké variabilitě v morfologických znacích existuje velké množství genotypů máty.

Rostliny jsou charakteristické pro své specifické aroma. Jedná se o trvalé byliny široce využívané v potravinářském průmyslu, v medicíně, v kosmetickém odvětví a ve farmaceutickém průmyslu. Rostliny máty mají nejčastěji větvenou lodyhu, květenství bývá husté a květy se vyznačují malou velikostí. Lodyha má obvykle čtyřhranný tvar. Květy jsou v naprosté většině oboupohlavné. Kalich je pravidelný a je rozdělen do cípů trojúhelníkového tvaru. Vzdrust rostlin může dosahovat až 120 cm. Díky tendenci rodu máty rychle a nekontrolovaně se rozšiřovat ve vlhkých půdách jsou rostliny zařazovány mezi invazivní (Brahmi *et al.*, 2017).

Máta může být využívána buď ve své přírodní formě, nebo jsou rostliny využity k produkci extraktů či silic. Silice máty jsou lipofilní látky produkované specializovanými rostlinnými pletivy zvanými žlaznaté trichomy. Silice se vyznačují obsahem těkavých organických látek, jako jsou flavonoidy, terpenoidy a fenolické kyseliny. Obecně slouží tyto látky rostlině k přilákání opylovačů a jako ochrana před parazity, patogeny a býložravci (Dudavera *et al.*, 2004). Majoritními složkami silic máty jsou monoterpeny, seskviterpeny a jejich deriváty. Zastoupení těchto látek se liší mezi jednotlivými genotypy a je také závislé na ročním období (Hajlaoui *et al.*, 2010). Antioxidační aktivitu vykazují jak silice, tak i extrakty získané z rostlin máty. Hlavními složkami v rostlinách máty odpovídajícími za antioxidační aktivitu jsou fenoly, karotenoidy a kyselina askorbová (Capecka *et al.*, 2005).

Silice mají široké použití ve výrobě léčiv a parfémů. Už od pradávna jsou rostliny máty využívány pro své příznivé účinky na lidský organismus, poskytují úlevu při onemocněních jako nachlazení, chřipka a při problémech s trávením (Therdthai a Zhou, 1994). Rostliny máty mají významné terapeutické účinky, mají charakter antioxidační, antimikrobiální a protizánětlivý, z čehož vyplývá jejich možné využití v lékařství (Shaikh *et al.*, 2014). Významný je jejich spasmolytický účinek (uvolňují hladké svalstvo).

## 2.1.1 Genotypy máty

### 2.1.1.1 Původní druhy máty

Z hlediska taxonomie je rozlišováno pět původních euroasijských a afrických druhů rodu máty – *M. arvensis* L., *M. aquatica* L., *M. spicata* L., *M. longifolia* L., *M. suaveolens* L. Tyto původní druhy hybridizovaly za vzniku velké řady dnes známých genotypů.

Jedním z nejvýznamnějších druhů je *Mentha spicata* (máta klasnatá). Tato rostlina dosahuje výšky až 100 cm a její stonek má čtvercový tvar. Je široce využívána v potravinářském průmyslu jako ochucovadlo, k výrobě zubních past a nápojů. Jejím dalším významným užitím je výroba agrochemikálií. Hlavními komponenty silice *Mentha spicata* jsou limonen, karvon,  $\alpha$ -terpinen a isokaryofylen (Chauhan, 2009). Silice máty klasnaté inhibuje klíčení a růst širokolistého plevele (Chalkos *et al.*, 2010). Tento účinek může být zúžitkován při skladování zemědělských plodin, například brambor (Coleman *et al.*, 2001).

*Mentha aquatica* (máta vodní) roste na březích vodních ploch. Spolu s *Mentha spicata* vytváří sterilní hybrid *Mentha piperita*. Oddenky máty vodní mají plazivé přízemní výběžky. Květy se vyznačují malou velikostí a fialovým zbarvením, lodyha bývá vysoce větvená a je často porostlá chlupy. Rostliny dorůstají výšky až 90 cm. Majoritní složkou silice máty vodní je menthofuran (11,4-33 %) (Baser *et al.*, 1999; Lawrence, 1978).

*Mentha longifolia* neboli máta dlouholistá (synonymum *Mentha spicata* var. *longifolia*) dorůstá výšky okolo 100 cm. Barva květů je světle fialová až růžová a oddenky rostliny mají podzemní výběžky. Jedná se o genotyp rostoucí v blízkosti

vodních toků. Jejich plodem jsou tvrdky, které mají hnědé zbarvení. Majoritními složkami silice jsou *cis*-piperiton oxid, *trans*-piperiton oxid a karvon (Lawrence, 1978; Baser *et al.*, 1999).

Genotyp *Mentha suaveolens* (máta vonná) je typický pro jižní a západní Evropu. Vlastnostmi je podobný genotypu *Mentha spicata* a dosahuje výšky až 100 cm. Od ostatních genotypů je snadno rozpoznatelný specifickou ovocnou vůní, květy mají bílé nebo světle růžové zbarvení. Hlavními složkami silice jsou piperiton oxid a piperitenon oxid (Lawrence, 1978).

*Mentha arvensis* (máta rolní) dosahuje výšky 0,5 - 1 m. Jedná se o rostlinu nepůvodní České republice (archeofyt). Vyznačuje se velkou proměnlivostí, na různých stanovištích lze pozorovat odlišnou výšku rostlin, velikost květů a tvar listů. Zkoumáním silice byla zjištěna velká variabilita složek. Častou majoritní složkou silice je menthol, mezi sloučeniny vyskytující se v této silici patří také linalool, terpinen-4-ol,  $\beta$ -pinen a isokaryofylen (Lawrence, 2007).

### 2.1.1.2 Máta peprná

Významným zástupcem rodu máty je *Mentha piperita* (máta peprná). Jedná se o hybrid *Mentha spicata* a *Mentha aquatica* (Tiwari, 2016). Rostliny dosahují výšky až 100 cm. Lodyha bývá vzpřímená a vyznačuje se slabým ochlupením. Květy jsou růžové. Listy obsahují až 2 % silic. Velké množství studií odhalilo více než 300 složek silic máty peprné. Silice běžně obsahuje menthol (30-55 %), dále menthon (14-32 %), menthofuran a pulegon (Kumar *et al.*, 2011). Vyznačuje se významnými antioxidačními, antimikrobiálními a protinádorovými účinky. Majoritní složky menthol a menthon jsou zodpovědné za typickou chuť a aroma, pulegon působí jako přírodní insekticid. Díky své příjemné chuti je bylina využívána k výrobě čajů a dochucovadel. Má anestetické účinky a využívá se také při vyrážkách.

Jednou z odrůd máty peprné je *Mentha piperita* cv. 'Perpeta'. Jedná se o domácí kultivar s nižším vzrůstem. Listový řapík má fialové zbarvení. Vyznačuje se vysokým obsahem silice. Nejčastější je její využití v potravinářství jakožto ochucovadlo nebo k přípravě čajů. Je náchylná k napadení rzí mátovou, což se projevuje vznikem rezavých skvrn na listech rostlin. Toto onemocnění je způsobeno rostlinným patogenem *Puccinia Menthae*.

*Mentha piperita* var. *citrata* je genotyp vyšlechtěný z máty peprné. Jejími synonymy jsou *Mentha aquatica* var. *citrata* a *Mentha citrata*. Vyznačuje se pronikavou citrusovou vůní. Tento genotyp je podobný druhu *Mentha aquatica*. Dorůstá výšky až 60 cm. Majoritními složkami silice *Mentha citrata* jsou linalyl acetát (14,8-60 %) a linalool (19-51,5 %) (Bahl *et al.*, 2000; Lincoln *et al.*, 1986). Mezi nejčastější využití silic patří odvětví parfumerie.

Genotyp *Mentha piperita* 'Bergamotová' je typický pro své bergamotové aroma (voní jako ovoce *Citrus bergamia*). Květy mají růžovou barvu. Jedná se o sterilní hybrid, v přírodě se běžně nevyskytuje a dorůstá výšky až 60 cm. Nenese stopy hořkosti a je tedy vhodný pro využití k potravinářským účelům.

### 2.1.1.3 Další genotypy máty

*Mentha pulegium* (Polej obecná) je genotyp typický pro jihozápadní a střední Evropu. V České republice se zařazuje mezi kriticky ohrožené a chráněné genotypy. Rostliny dosahují výšky 40 cm a mají zejména nadzemní výběžky. Silice je typická pro vysoký obsah pulegonu a nejčastěji je využívána jako insekticid. Vykazuje toxické účinky, při vyšších koncentracích může dojít po požití u těhotných žen k vyvolání potratu.

*Mentha cervina* dorůstá výšky 0,3 m, její květy mají růžovo-fialové zbarvení a listy se vyznačují drobnou velikostí. Jedná se o genotyp příbuzný *Mentha pulegium*. Pro silici je typický vysoký obsah pulegonu a dále se v ní také vyskytují látky piperitenon, isomenthon, menthon a mentyl acetát (Lawrence, 1978). Silice *M. cervina* se skládá především z monoterpenů. Z hlediska využití je významné ochucování potravy, kdy je silice využívána spolu s *M. pulegium* nebo jako její náhrada. Pro své příznivé účinky je také *M. cervina* využívána při problémech se zažíváním nebo při zánětech dýchacího systému. Genotyp je pokládán za téměř ohrožený kvůli rychlému poklesu populace (Miguel *et al.*, 2016).

*M. villosa* (máta huňatá) je genotyp vzniklý křížením *M. spicata* a *M. suaveolens*. Listy mají světle zelenou barvu a jsou hustě pokryty chloupky, barva květů je světle růžová. Majoritní složkou silice je karvon, přítomné je také vysoké množství piperiton oxidu a piperitenon oxidu (Lawrence, 2007). Z hlediska využití je významné ochucování potravin, příprava čajů a aplikace v tradiční medicíně.

*Mentha microphylla* (máta klasnatá východní) je synonymem genotypu *Mentha spicata subsp. condensata*. Jedná se o poddruh máty klasnaté, který pravděpodobně vznikl křížením *M. longifolia* a *M. suaveolens*. Tento genotyp je původní jižní Evropě. Lodyha je hustě porostlá chlupy šedé barvy. Hlavní složkou silice je karvon (Lawrence, 1978).

## 2.2 Sekundární metabolity rostlin

Rozdíl mezi primárními a sekundárními metabolity rostlin spočívá v tom, že primární metabolity jsou oproti sekundárním nezbytné pro základní životní procesy rostlin. Mezi primární metabolity patří nukleové kyseliny, sacharidy, aminokyseliny, lipidy a meziprodukty katabolických a anabolických reakcí probíhajících ve všech živých organismech. Sekundární metabolity nemají přímý metabolický význam a vyskytují se pouze u některých rostlinných čeledí. Jedná se zejména o terpenoidy, flavonoidy, fenylpropanoidy, aminy a alkaloidy. Jejich nejvýznamnější funkcí je přilákání opylovačů a dále také slouží jako ochrana rostliny před patogenními mikroorganismy. Nejčastěji jsou tyto látky využívány ve farmaceutickém průmyslu (antibiotika), v průmyslu potravinářském (barviva) a v zemědělství jako insekticidy (Heldt, 2005).

Rostliny máty se vyznačují obsahem více skupin sekundárních metabolitů, jedná se zejména o terpenoidy a fenolické sloučeniny. Silice máty obsahuje terpenoidy (monoterpeny, seskviterpeny a jejich deriváty). Hlavními fenolickými složkami máty jsou fenylpropanoidy (zejména flavonoidy) a fenolické kyseliny. (Fialová *et al.*, 2014).

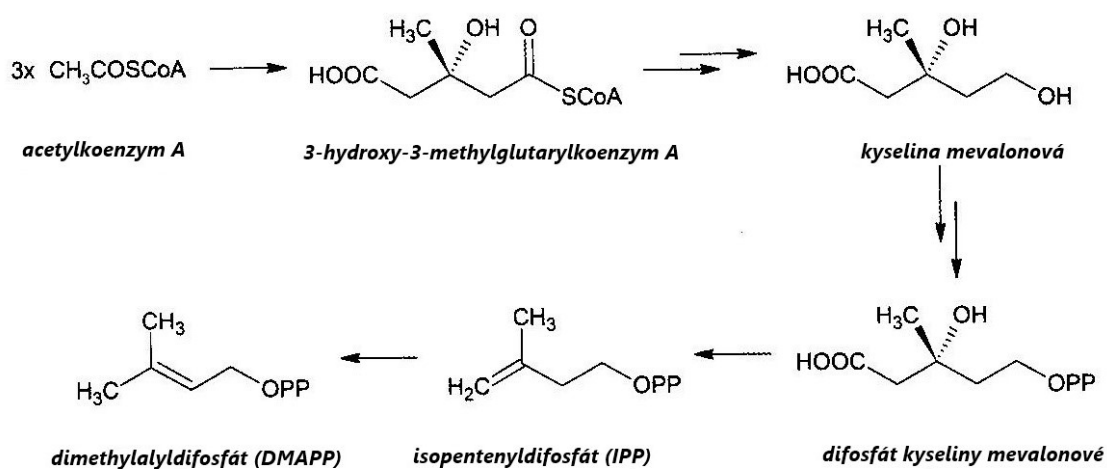
### 2.2.1 Terpenoidy a jejich syntéza

Terpenoidy tvoří jednu z nejvýznamnějších skupin sekundárních metabolitů rostlin. Dalším používaným názvem jsou isoprenoidy, jelikož rozkladem terpenoidů dochází ke vzniku isoprenu (2-methyl-buta-1,3-dien). Existují dvě možné cesty biosyntézy terpenoidů, cesta mevalonátová (Obr. 1) a methylerytritolfosfátová (Obr. 2). Biosyntéza terpenoidů probíhá v endoplazmatickém retikulu, v plastidech a v mitochondriích rostlin. Základními stavebními jednotkami jsou pětiuhlíkaté látky isopentenylidifosfát nebo dimethylallyldifosfát (Nagy *et al.*, 2011). Biosyntéza může být rozdělena do čtyř obecných kroků. V prvním kroku dochází ke vzniku isopentenylidifosfátu (IPP). V dalším kroku probíhají postupné adice IPP, ve třetím kroku dochází k cyklizaci



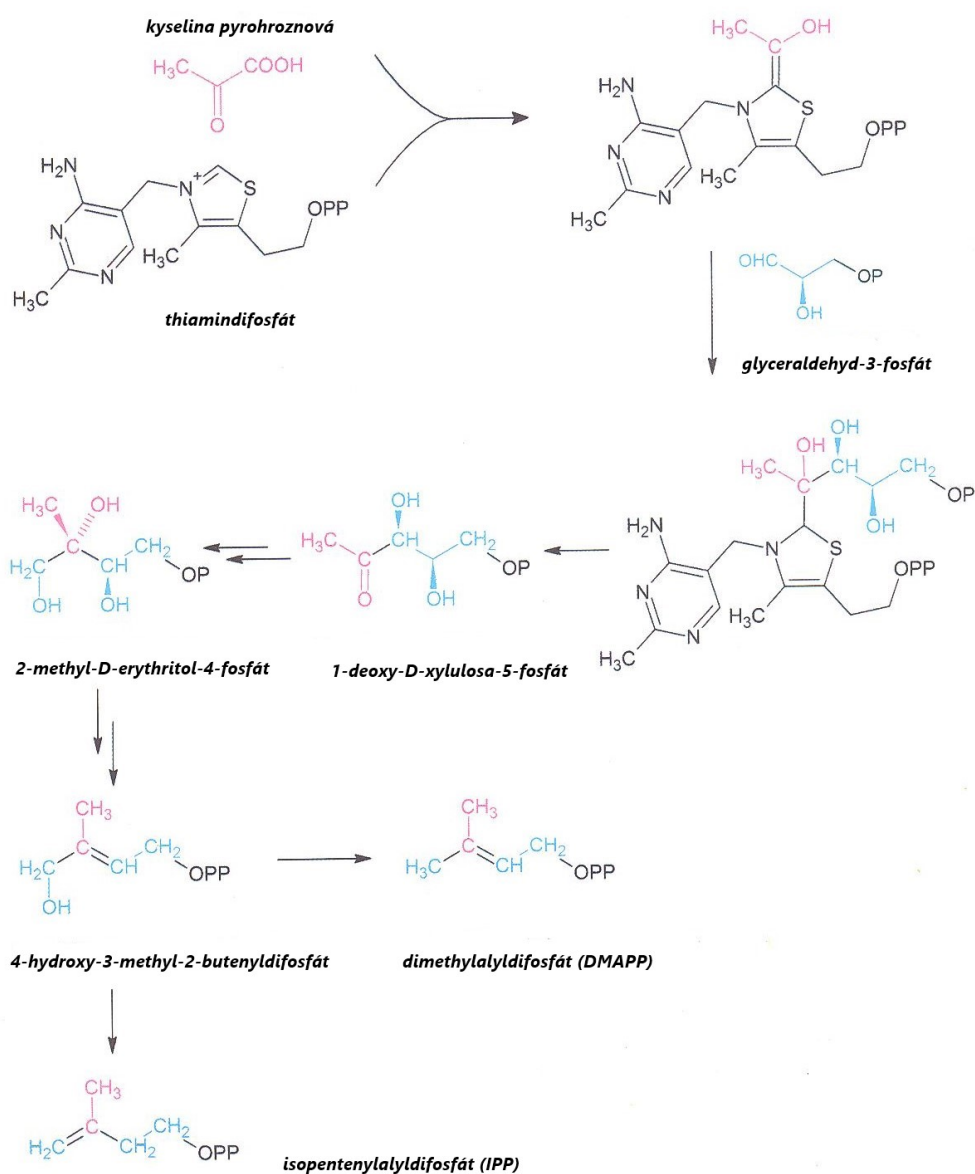
a vznikají kostry terpenoidů. V posledním kroku dochází k modifikacím (hydroxylace, oxidace) za vzniku vlastních terpenoidů (Heldt, 2005).

Výchozí látkou pro syntézu isopentenyldifosfátu mevalonátovou cestou je acetylkoenzym A. Ze tří molekul acetylkoenzymu A vzniká 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A, který je redukován za vzniku kyseliny mevalonové, z níž vzniká isopentenyldifosfát (IPP). Může docházet k izomerizaci IPP na dimethylalyldifosfát (DMAPP). Mevalonátová dráha je lokalizována v cytosolu a slouží k syntéze sterolů a některých seskviterpenů.



Obr. 1 Mevalonátová cesta biosyntézy terpenoidů. Upraveno dle: Nagy *et al.*, 2011.

Druhou možnou cestou biosyntézy terpenoidů je dráha methylerytritolfosfátová, která je lokalizována v plastidech. Prekurzory jsou látky pyruvát a D-glyceraldehyd-3-fosfát. V prvním kroku dochází k adici pyruvátu na thiamindifosfát za vzniku derivátu hydroxyethylthiaminu. Následuje transketolázová reakce s D-glyceraldehyd-3-fosfátem a vzniká 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát, který je redukován na 2-methyl-D-erythritol-4-fosfát. Následují dva redukční kroky, dehydratace a fosforylace a vzniká produkt isopentenylidifosfát. Tato dráha probíhá v plastidech a slouží k syntéze monoterpenů (například pinenu a limonenu), diterpenů a tetraterpenů (Heldt, 2005).

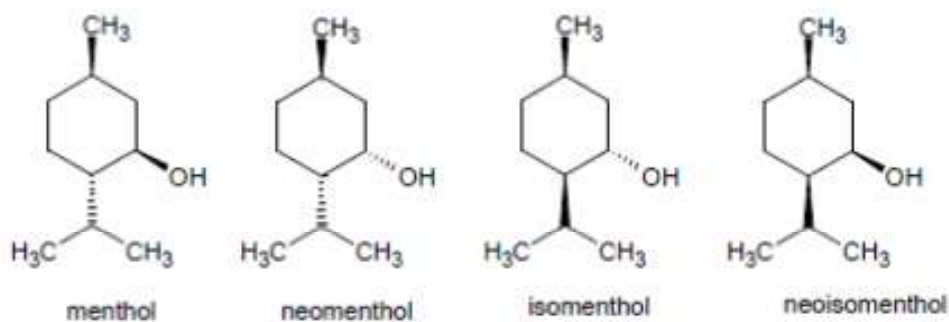


Obr. 2 Methylerytritolfosfátová cesta biosyntézy terpenoidů. Upraveno dle: Nagy *et al.*, 2011.

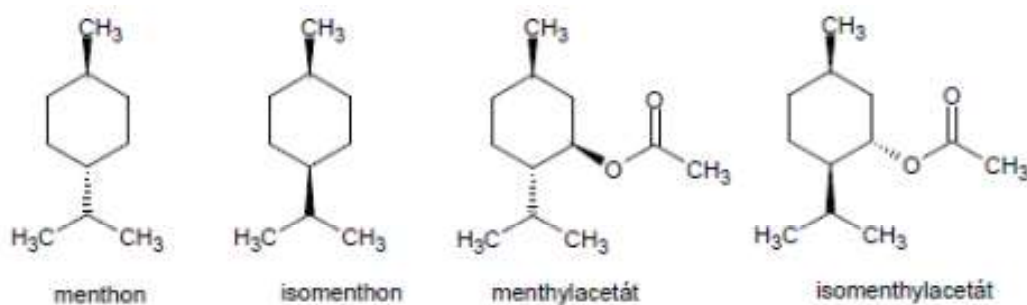
### 2.2.1.1 Skupiny terpenoidů a jejich výskyt v silici máty

Terpenoidy jsou rozdělovány dle počtu isoprenoidních jednotek na hemiterpeny, monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, sesterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny. Silice máty obsahují monoterpeny a seskviterpeny. Monoterpeny jsou sloučeniny obsahující deset uhlíků. Vznikají spojením dvou IPP, produktem je geranyldifosfát (GPP). Ten může být izomerizován na linalyldifosfát (LPP). Modifikacemi těchto dvou látek vznikají acyklické, monocyklické a bicyklické monoterpeny. Se seskviterpeny tvoří monoterpeny významné složky silic rostlin, zejména čeledi *Lamiaceae* (Hluchavkovité) a *Asteraceae* (Hvězdicovité).

Nejvýznamnějšími acyklickými monoterpeny obsaženými v silicích máty jsou linalool, linalylacetát a nerol. Monocyklické monoterpeny jsou nejčastěji odvozené od *p*-menthanu. Výjimku tvoří *p*-cymen, který je aromatický (Velíšek a Hajšlová, 2009). V silicích máty je obsaženo velké množství monocyklických monoterpenů, jedná se například o limonen,  $\alpha$ -terpinen,  $\gamma$ -terpinen, *p*-cymen, thymol, karvon, eukalyptol a menthol. Menthol je hydroxyderivát, který tvoří až 45% silice máty peprné. Vyznačuje se antiseptickými účinky. Má čtyři přírodní stereoisomery, jsou to menthol, neomenthol, isomenthol a neoisomenthol (Obr. 3). V silicích jsou dále obsaženy příslušné ketony menthon a isomenthon (Obr. 4), které mohou být esterifikovány na mentyl acetát či isomentyl acetát (Nagy *et al.*, 2011).



Obr. 3 Přírodní stereoisomery mentholu.



Obr. 4 Strukturální vzorce ketonů mentholu a produkty jejich esterifikace.

Nejvýznamnější bicyklické monoterpeny jsou deriváty pinenu ( $\alpha$ -pinen a  $\beta$ -pinen), thujen, kamfen a fenchon. Thujen se vyskytuje v přírodě ve formě dvou izomerů ( $\alpha$ -thujen a  $\beta$ -thujen) a je obsažen pouze u části genotypů máty. Jedná se o látku s neurotoxickými účinky.

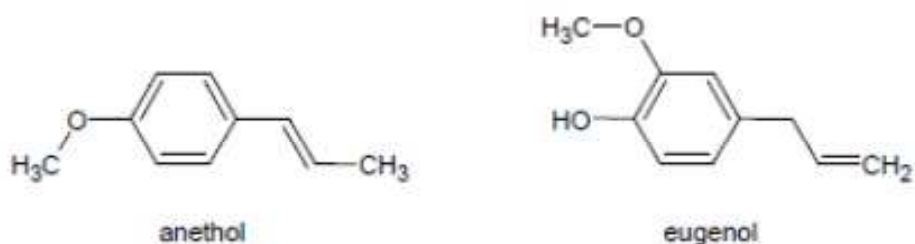
Seskviterpeny se skládají z 15 uhlíků a výchozí sloučeninou pro jejich syntézu je farnesyldifosfát. Mohou být acyklické, mono- či dicyklické. Nejčastěji jsou v silicích máty přítomny seskviterpeny isokaryofylen, germakren, humulen a kadinen. Významný je také farnesen, který má dva stereoisomery a je využíván v tradiční medicíně k léčbě kašle a astmatu.

### 2.2.2 Fenylpropanoidy

Fenylpropanoidy jsou zařazovány mezi šikimáty. Společnou vlastností těchto látek je přítomnost nejméně jednoho *orto*-disubstituovaného fenylu v molekule, nejčastěji bývá substituentem hydroxylová skupina (Nagy *et al.*, 2011). Do této skupiny je zařazována velká řada derivátů fenolů, například kumariny, lignany a flavonoidy. Šikimáty mají významné funkce v rostlinách, mají stavební funkci, slouží k přilákání opylovačů a mohou působit jako přírodní pesticidy. Jedná se o látky vznikající šikimátovou biosyntetickou cestou. Kyselina šikimová (3,4,5-trihydroxy-cyklohex-1-en-1-karboxylová kyselina) je významným primárním metabolitem rostlin. Výchozí látky pro syntézu fenolů šikimátovou cestou pochází z glykolýzy a pentosafosfátového cyklu. Prvním cyklickým produktem cesty je kyselina 3-dehydrochinová, která je poté přeměňována na kyselinu šikimovou. Ta může být aktivována a přeměněna přes kyselinu chorizmovou na významný meziprodukt kyselinu pferenovou, která může být výchozí látkou například pro syntézu aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a alkaloidů.

Molekula fenylpropanoidů má dvě části, z čehož se odvíjí název této skupiny. První je jednotka C6 (fenyl), druhou jednotkou vedlejší C3 řetězec. Obecně je možné pokládat fenylpropanoidy za výchozí skupinu tvorby ostatních skupin šikimátů. Uskupení C6-C3 je přítomno i u flavonoidů a kumarinů (Nagy *et al.*, 2011). Mezi šikimáty patří například hydroxykumariny, fenylpropeny, ligniny, deriváty kyseliny benzoové, flavonoidy, jednoduché fenoly a naftochinony. Nejvýznamnějšími zástupci fenylpropanoidů jsou kyselina skořicová, kyselina *p*-kumarová a kyselina kávová. Kyselina skořicová vzniká deaminací fenylalaninu, zatímco deaminací tyrosinu dochází ke vzniku kyseliny *p*-kumarové.

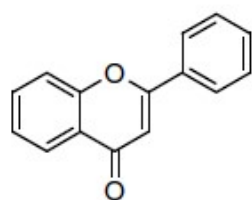
Fenylpropeny tvoří významnou součást silic rostlin. Jsou zodpovědné za typickou vůni silic díky těkavým vlastnostem, které jsou způsobeny zejména nízkou molekulovou hmotností a nízkou polaritou těchto látek. Mezi nejvýznamnější zástupce fenylpropenů vyskytujících se v silicích máty patří anethol a eugenol (Obr. 5). Jedná se o látky využívané pro své antiseptické vlastnosti a k výrobě parfémů.



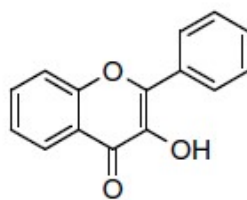
Obr. 5 Strukturální vzorce fenylpropenů anetholu a eugenolu.

Mezi nejvýznamnější deriváty kyseliny benzoové patří kyselina salicylová, kyselina gallová a kyselina *p*-hydroxybenzoová, jejíž syntéza vychází z kyseliny *p*-kumarové. Derivátem kyseliny salicylové je kyselina acetylsalicylová, která je využívána ve farmaceutickém průmyslu jako antipyretikum.

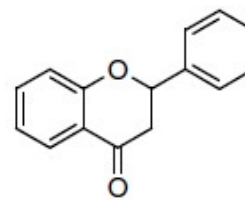
Flavonoidy se řadí mezi nejrozšířenější sekundární metabolity rostlin. Jsou odvozené od benzopyranu (chromanu) s postranním fenylem v polohách C-2 nebo C-3 (Macholán, 2003). Obecně jsou tyto sloučeniny rozpustné ve vodě a mají často žluté zbarvení. Tři základní struktury flavonoidů jsou flavon, flavonol a flavonon (Obr. 6). Dále bývají rozeznávány skupiny flavonoidů s dihydroflavonolým a isoflavonovým skeletem. Mezi flavonoly je zařazován kvercetin, který se vyznačuje antioxidační aktivitou. Příkladem látky s flavononovým skeletem je naringenin.



*flavon*



*flavonol*



*flavonon*

Obr. 6 Základní skelety flavonoidů.

### 2.2.3 Alkaloidy

Alkaloidy jsou sekundární metabolity odvozené z aminokyselin a vyznačují se tím, že obsahují jeden či více heterocyklicky vázaných dusíků. Alkaloidy mohou být obsaženy v houbách (*Penicillium*, *Aspergillus*), nejčastěji se ovšem vyskytují u mnoha čeledí krytosemenných rostlin, zejména u čeledí Lilkovitých, Makovitých, Dřišťálovitých a Liliovitých. Alkaloidy mají silný fyziologický účinek, rostlinám slouží jako ochrana před mikroorganismy a od pradávna byly využívány k produkci jedů a léčiv. Naprostá většina je opticky aktivní a má bazický charakter. Alkaloidy můžeme rozdělit dle jejich podstaty na alkaloidy odvozené od ornitinu, lysinu, kyseliny asparágové, tyrosinu, tryptofanu, histidinu, argininu, kyseliny anthranilové. Mohou také vznikat transaminačními reakcemi (Nagy *et al.*, 2011).

Mezi nejvýznamnější alkaloidy odvozené od ornitinu patří alkaloidy tabáku a tropanové alkaloidy. Nikotin je tvořen v kořenech rostliny *Nicotiana tabacum* (tabák virginský). Jedná se o vysoce návykovou látku, která je široce využívána k produkci tabáku. Dříve byl nikotin používán jako pesticid. Mezi tropanové alkaloidy patří atropin, skopolamin a kokain. Atropin je obsažen v rulíku zlomocném (*Atropa belladonna*) a v nízkých dávkách rozšiřuje zornice, proto je využíván v očním lékařství. Koniin je alkaloid s piperidinovým cyklem odvozený od lysinu. Jedná se o silný jed, který způsobí ochrnutí svalstva. Biosyntéza morfinu probíhá z tyrosinu. Morfin je látka s narkotickými účinky a jejím methyletherem je kodein, který se využívá pro léčbu kašle. Acetylací dvou hydroxylových skupin morfinu dochází k tvorbě heroínu, čímž dojde k několikanásobnému zvětšení účinků (Macholán, 2003).

Mezi alkaloidy odvozené od tryptofanu patří například chinolinový alkaloid chinin. Jedná se o látku s antipyretickými účinky využívanou v léčbě proti malárii. Dalším významným alkaloidem je strychnin, který je velmi silným jedem a dnes je využíván nejčastěji jako pesticid. K alkaloidům mohou být také zařazovány xantinové deriváty s purinovým skeletem. Xantinové deriváty obsahují čtyři atomy dusíku, nejsou ovšem bazické, proto se nejedná o pravé alkaloidy. Jejich zástupci jsou theofylin, theobromin a kofein. Theofylin a theobromin mají diuretické účinky a kofein stimuluje centrální nervovou soustavu.

## **2.3 Metody izolace sekundárních metabolitů rostlin**

### **2.3.1 Metody získávání silic**

Majoritní složku silic máty tvoří terpenoidy. Základní metodou izolace silic z rostlin je destilace, jejímž principem je oddělování látek na základě rozdílné teploty varu. Jedná se o jednoduchou metodu, která byla používána již ve starověku.

#### **2.3.1.1 Destilace vodní parou**

Významnou metodou izolace silic je destilace vodní parou. Tato metoda je založená na Daltonově zákoně a využívá se pro destilaci látek s vysokými body varu. Součástí aparatury je vyvíječ vodní páry, pojistná trubice a destilační baňka, která je zahřívána spolu s vyvíječem vodní páry (Galuszka a Luhová, 2005).

##### **2.3.1.1.1 Hydrodestilace**

Pro izolaci silic máty bývá využívána nejčastěji metoda hydrodestilace. Jedná se o formu destilace vodní parou, rozdíl spočívá v nepřítomnosti vyvíječe vodní páry. Hydrodestilace je velmi šetrnou metodou, teplota nedosahuje 100°C a tím je zamezováno zvýšenému riziku dekompozice sloučenin. Aparatura pro hydrodestilaci se skládá z varné baňky se zátkou, z chladiče a z jímací nádoby. Rostlinný materiál je umístěn do varné baňky, která je naplněna destilovanou vodou (nejvýše do  $\frac{3}{4}$  objemu baňky). Při zahřívání baňky dochází k přechodu těkavých látek do plynné fáze. V chladiči dochází ochlazováním ke kondenzaci par a kondenzát začíná stékat do jímací nádoby.

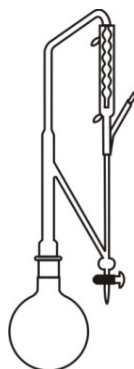
V průběhu destilace tvoří složky silic a voda azeotropní směs. Silice se nemísí s vodní fází a po kondenzaci dochází k jejich separaci, která je provedena dekantací. Vodní fáze je také nazývána hydrosol a je využívána v kosmetickém průmyslu. Hydrosol obsahuje velmi nízké množství složek silic a při hydrodestilaci může docházet ke zvýšeným ztrátám (Salvador a Chisvert, 2017).

##### **2.3.1.1.2 Hydrodestilace podle Clevengera**

Často bývá pro hydrodestilaci využívána aparatura Clevengerova typu (Obr. 7). Její součástí je varná baňka spojená se skleněnou trubicí, chladič a extraktor, jímž je



skleněná kapilára se stupnicí. Kapilára je spojena diagonálně se skleněnou trubicí připojenou k varné baňce. V kapiláře dochází k oddělování vodné fáze a silice. Clevengerova aparatura je využívána pro snížení ztrát silic – v průběhu destilace dochází ke kondenzaci vodné fáze, která následně kape do kapiláry. Část hydrosolu je navracena do varné baňky přes diagonální skleněnou trubicí. Recyklací hydrosolu se také snižuje množství vody potřebné k provedení hydrodestilace.



Obr. 7 Aparatura Clevengerova typu. Převzato z: <http://medilabexports.com/>

### **2.3.1.2 Enfleuráž**

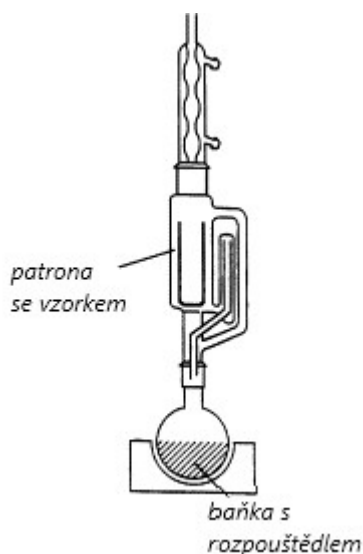
Enfleuráž je jednou z nejstarších metod zisku silic. Je založena na extrakci vonných složek rostlin tukem. Celé rostliny či pouze jejich květy jsou vloženy na vrstvu živočišného či rostlinného tuku bez zápachu a jsou zde ponechány při pokojové teplotě po dobu několika dnů. V případě potřeby může být postup opakován. Lipofilní silice rostlin postupně difundují do tuku a vzniká tzv. pomáda. K této směsi je přidán alkohol, který se odpaří za zisku silice. Tato metoda není již v dnešní době kvůli časové náročnosti využívána.

### **2.3.2 Metody extrakce fenylypropanoidů**

Je udáváno, že fenolické sloučeniny majoritně zodpovídají za antioxidační aktivitu rostlin. Existuje velká řada extrakčních metod, které jsou používány pro extrakci fenylypropanoidů rostlin. Nejčastěji je využívána Soxhletova extrakce, ultrazvuková extrakce a extrakce pomocí rozpouštědel (Zhang *et al.*, 2018; Handa *et al.*, 2008).

#### **2.3.2.1 Soxhletova extrakce**

Extrakce je významnou separační metodou, při které dochází k přechodu látek do fáze rozpouštědla. Pro extrakci fenylypropanoidů je nejčastěji využívána Soxhletova aparatura (Obr. 8). Součástí aparatury pro Soxhletovu extrakci je varná baňka, chladič a extrakční nástavec (patrona). Patrona obsahuje extrahovanou látku v pevném skupenství. Varná baňka, ve které je umístěno rozpouštědlo, je zahřívána a páry rozpouštědla se kondenzují v patroně a prochází přes vzorek. Rozpouštědlo s obsaženými analyty putuje zpět do baňky a proces se opakuje. Výhodou je, že přes vzorek vždy prochází čisté rozpouštědlo. Nevýhodou této metody je vyšší časová náročnost a nemožnost využití pro teplotně labilní látky (Handa *et al.*, 2008).



Obr. 8 Soxhletův přístroj. Upraveno dle: Reeve (1994).

### 2.3.2.2 Extrakce ultrazvukem

Při práci s rostlinným materiálem je ultrazvuková extrakce moderní alternativou běžných extrakčních metod. Významnými parametry pro práci s ultrazvukem jsou výběr vhodného rozpouštědla a teplota. Vzorek v pevném skupenství je vložen do rozpouštědla a je umístěn na ultrazvuk. Působením ultrazvukového vlnění dochází k rozpadu buněčných stěn rostlinného materiálu, čímž je urychlena extrakce. Běžně jsou využívány frekvence od 20 do 100 kHz. Nejčastěji jsou pro extrakci využívány ultrazvukové lázně, které pracují s frekvencí blízkou 40 kHz a mají nastavitelnou teplotu. Ultrazvuková extrakce může být také kombinována s běžnými typy extrakcí, například se Soxhletovou extrakcí. V tomto případě je výhodou zachování příznivých vlastností Soxhletovy extrakce (extrakce je opakována vždy dávkou čistého rozpouštědla) a zároveň dochází použitím ultrazvuku ke zkrácení extrakčního času (Gupta *et al.*, 2012).

### 2.3.2.3 Extrakce rozpouštědly

Extrakce pomocí rozpouštědel je nejčastěji využívána pro získání látek s antioxidačními vlastnostmi. Cílem extrakčního procesu je získat danou látku v co nejvyšším množství a ve vysoké kvalitě. Účinnost extrakce je závislá na použitém typu rozpouštědla, na jeho koncentraci, na extrakčním čase, teplotě a celé řadě dalších faktorů. Nejčastěji jsou pro práci s rostlinným materiálem využívána rozpouštědla methanol, ethanol a aceton. Tato rozpouštědla jsou často mísená s vodou, čímž je dosaženo vzniku vhodného

polárního média pro extrakci polyfenolů. Přidáním malého množství vody k organickému rozpouštědlu dochází ke zvýšení polarity média, čímž je zvýšena účinnost extrakce díky obsahu hydrofilních látek ve vzorku. Nejvhodnějším rozpouštědlem pro extrakci fenolických látek z rostlinného materiálu je methanol, který inhibuje činnost polyfenol oxidasy, která způsobuje oxidaci polyfenolů (Bimakr *et al.*, 2011).

### **2.3.3 Metody purifikace**

Po provedení extrakce je často nutné extrakty přečistit - odstranit nežádoucí látky. Nepochybně lze odstranit pomocí extrakce na pevné fázi, nejčastěji s využitím kolonek SPE (solid-phase extraction). Nežádoucí látky jsou zachycovány na sorbentu, zatímco stanovené látky prochází přes kolonu. SPE metoda je také využívána pro zakoncentrování vzorků. Přečištění extraktů je také možné metodou sloupcové chromatografie (Wells, 2000).

## **2.4 Metody charakterizace přírodních produktů**

### **2.4.1 Metody analýzy terpenoidů**

#### **2.4.1.1 GC-FID chromatografie**

Významnou metodou analýzy organických sloučenin je plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID). Nosným plynem je vodík s další plynnou látkou. Metoda je založena na detekci iontů, které vznikají po spálení vzorku plamenem vytvářeným hořením vodíku. Součástí přístroje jsou dvě elektrody, které jsou součástí obvodu, v němž jsou nosiči náboje nabitě částice. Pro analýzu je důležitý rozdíl mezi tokem proudu, který vzniká protečením čistého nosného plynu a tokem proudu vznikajícího protečením nosného plynu se vzorkem. S rostoucí ionizací roste elektrický proud, protože roste počet nabitých iontů (Soilhi *et al.*, 2019).

#### **2.4.1.2 GC-MS spektrometrie**

Nejvýznamnější technikou identifikace a kvantifikace terpenoidů je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Tato technika je založena na rozdělování látek dle jejich molekulové hmotnosti a je často využívána v toxikologii. Hmotnostní spektrometrie je využívána pro identifikaci složek separovaných plynovou chromatografií. Pro analýzu pomocí plynové chromatografie musí být látky teplotně stabilní a těkavé. Součástí aparatury je láhev s nosným plynem, nástřikové zařízení, GC kolona a detektor. Mobilní fáze je plynná, pro GC-MS bývá nejčastěji využíván vodík či helium. Stacionární fáze je imobilní a jedná se o kapalinu s vysokou molekulovou hmotností. Je umístěna na vnitřním povrchu chromatografické GC kolony.

Vzorky pro analýzu s využitím GC-MS jsou rozpouštěny v organických rozpouštědlech. Pro identifikaci terpenoidů v silicích jsou často připravovány roztoky silic v hexanu. Po dávkování vzorku do plynového chromatografu jsou složky vzorku převedené do plynné fáze. Mobilní fáze nese tyto složky přes kolonu s navázanou stacionární fází, zde dochází k interakci a některé složky vzorku se zdržují v koloně. Látky jsou oddělovány na základě své hmotnosti a těkavosti. Detektor následně analyzuje látky, které procházejí kolonou. Jako detektor bývá pro plynovou chromatografii nejvíce využíván hmotnostní spektrometr. V detektoru se nachází

iontový zdroj a dochází zde k ionizaci molekul prošlých kolonou nárazem elektronů. Vznikají molekulové ionty, které jsou následně separovány (Hawryl *et al.*, 2015).

Výsledkem měření jsou hmotnostní spektra jednotlivých složek vzorku a chromatogramy. Významnou konstantou je retenční čas, což je doba, za kterou daná látka projde kolonou. Látky s vysokou molekulovou hmotností mají obvykle vyšší retenční čas než nízkomolekulární látky. Retenční čas je dále také závislý na polaritě látek, složky s podobnou polaritou jako kapalná fáze budou v této fázi rozpustné a jejich retenční čas bude vyšší než u látek s rozdílnou polaritou. Identifikace složek vzorku probíhá na základě tzv. retenčních indexů (Kovatskových indexů) jednotlivých sloučenin a na základě hmotnostních spekter (Mellon, 2003).

Retenční (Kovatsovy) indexy lze vypočítat z retenčních časů složek dle následujícího vztahu:

$$RI_x = 100 \times n + 100 \times \frac{[\log(t'_x) - \log(t'_n)]}{[\log(t'_{n+1}) - \log(t'_n)]}$$

$n$ ...počet atomů uhlíku alkanu

$t'_x$ ...redukovaný retenční čas neznámé látky

$t'_n$ ...redukovaný retenční čas nižšího alkanu

$t'_{n+1}$ ...redukovaný retenční čas vyššího alkanu

(Upraveno dle: Babushok *et al.*, 2011).

Standardem pro plynovou chromatografii je homologní řada alkanů. Retenční index atomu uhlíku je stanoven jako 100 (například retenční index butanu je  $RI = 400$ ). Látka, kterou analyzujeme, musí eluovat mezi dvěma zvolenými standardními alkany. Pomocí tohoto vztahu lze vypočítat retenční index libovolné sloučeniny.

Analýza vzorků pomocí plynové chromatografie je vysoce citlivou metodou. Často je kombinována s hmotnostním spektrometrem s funkcí detektoru. Použitím běžné plynové chromatografie pro mnohosložkové směsi mohou jednotlivé eluční píky odpovídat více složkám vzorku (Hawryl *et al.*, 2015). Tento problém je vyřešen použitím techniky GC-MS.

### **2.4.1.3 Headspace analýza**

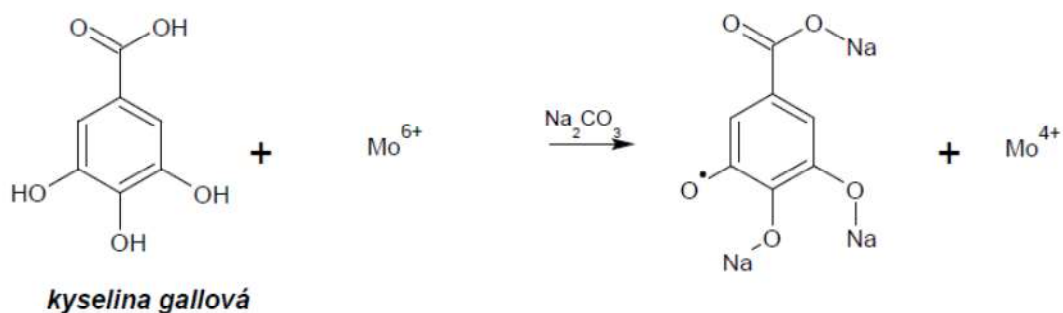
Metoda headspace umožňuje analyzovat plynné látky, ať už se nacházejí původně v pevné či kapalně fázi. Běžně jsou s využitím této metody analyzovány těkavé látky rostlin. Vzorok (nejčastěji ve formě suchého rostlinného materiálu) jsou hermeticky uzavřeny ve vialkách. Těkavé látky vzorku difundují do plynné fáze. Dochází k vyrovnání parciálních tlaků a mezi plynou a pevnou či kapalnou fází nastává rovnováha. Vzorek plynné fáze je dávkován do plynového chromatografu a dochází k separaci těkavých složek. Metoda headspace je nejčastěji využívána v potravinářském průmyslu (Wardencki, 2000).

### **2.4.2 Spektrofotometrické metody analýzy fenypropanoidů**

Fenolické látky jsou aromatické sloučeniny charakterizované obsahem alespoň jedné hydroxy- skupiny. Mezi fenolické látky patří například jednoduché fenoly, fenolické kyseliny, flavonoidy, kumariny a lignany. V rostlinách lze obsah těchto látek zjišťovat širokou řadou spektrofotometrických metod. Může být stanoven obsah celkových fenolů a flavonoidů (flavonolů a flavononů); (Woisky a Salatino, 1998).

#### **2.4.2.1 Stanovení celkových fenolů metodou Folin-Ciocalteu**

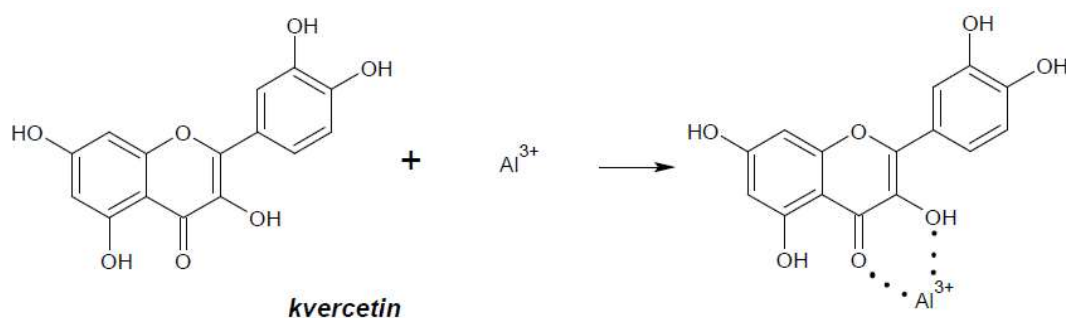
Obsah celkových fenolických látek vyskytujících se ve vzorcích je stanovován metodou Folin-Ciocalteu (Obr. 9). Používané Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje směs oxidů wolframu a molybdenu. V případě přítomnosti fenolů dochází v zásaditém prostředí k redukci činidla a současně probíhá oxidace fenolických látek, což se projeví změnou zbarvení (původně žlutě zbarvená směs se mění na modrou). Během reakce jsou vytvářeny komplexy kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, následně jsou na tyto komplexy přenášeny elektrony a dochází k jejich redukci. Produkty mají modré zbarvení a jejich absorpční maximum je 765 nm. Koncentrace celkových fenolů je přímo úměrná absorpci světla při absorpčním maximu (Waterhouse, 2003). Nevýhodou metody stanovení fenolů je časová náročnost a možné ovlivnění obsahem jiných látek, které mohou interagovat s činidlem a způsobovat jeho redukci (jedná se například o sacharidy). Při měření jsou proto často využívány standardy, například kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina).



Obr. 9 Princip stanovení fenolických látek metodou Folin-Ciocalteu.

### 2.4.2.2 Stanovení flavonolů kolorimetrickou metodou s $\text{AlCl}_3$

Obsah flavonolů v rostlinném materiálu je stanovován kolorimetrickou metodou s chloridem hlinitým. Jedná se o jednoduchou metodu založenou na tvorbě stabilních barevných komplexů flavonolů s hlinitým kationtem v bazickém prostředí (Obr. 10). Komplex je tvořen keto C-4 skupinou a C-3 nebo C-5 hydroxy- skupinou flavonolu a kationtem hliníku. Komplex má červené zbarvení, jeho absorpční maximum je 415 nm. Jako standard bývá využíván flavonol kvercetin (Struchkov, 2018).

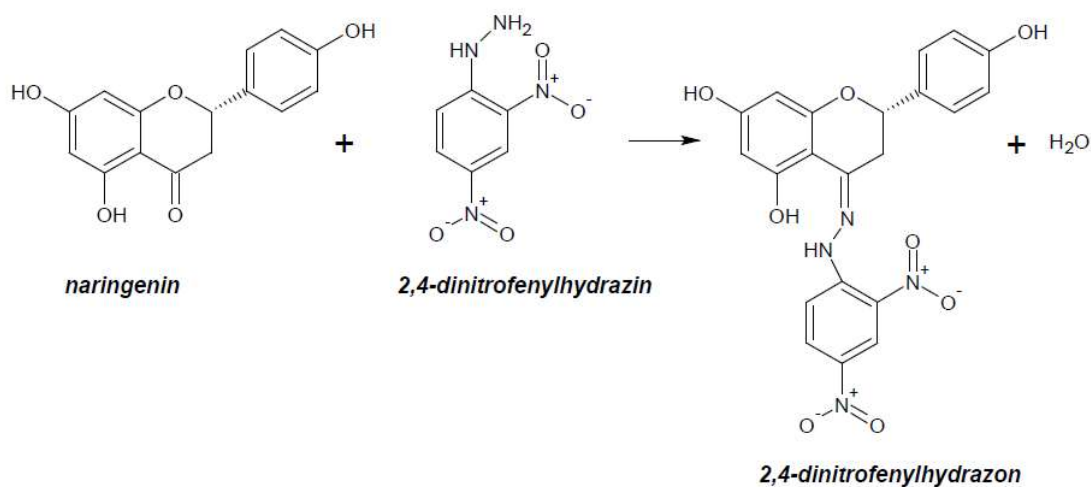


Obr. 10 Kolorimetrická reakce flavonolu s chloridem hlinitým.



### 2.4.2.3 Stanovení flavononů kolorimetrickou metodou s 2,4-DNPH

Flavonony mohou být stanovovány kolorimetrickou metodou s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (2,4-DNPH). Jako standard bývá využíván flavonon naringenin. Principem stanovení je reakce 2,4-dinitrofenylhydrazinu s keto- skupinou flavononu za vzniku 2,4-dinitrofenylhydrazonu (Obr. 11). Vzniklý produkt má hnědooranžové zbarvení. Absorpční maximum této látky je 495 nm (Woisky a Salatino, 1998).



Obr. 11 Kolorimetrická reakce flavononu naringeninu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem.

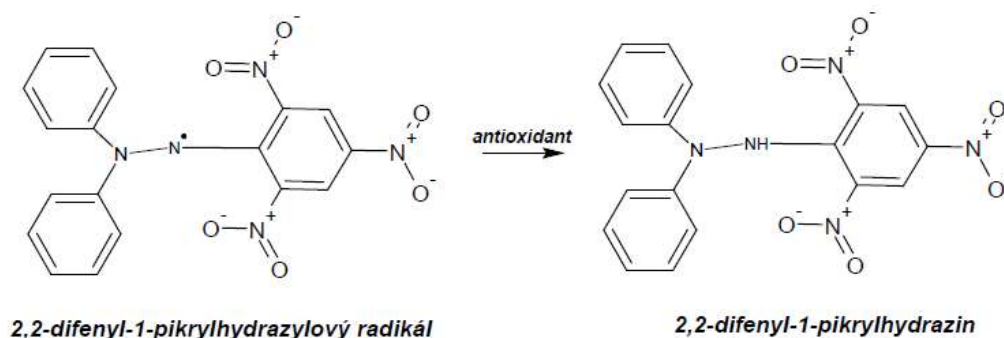
### 2.4.3 Stanovení antioxidační aktivity

Aromatické rostliny máty se vyznačují vysokým obsahem biologicky aktivních složek. Významnou skupinou jsou fenolické látky, které mají řadu příznivých účinků pro lidský organismus. Tyto látky mají zejména protivirové a protizánětlivé účinky. V poslední době je zkoumán především obsah flavonoidů v rostlinách máty a jejich možné působení při prevenci vzniku rakoviny. Protinádorová aktivita je dávana do souvislosti s antioxidační schopností těchto látek (Gomez *et al.*, 2003; Paulová *et al.*, 2004).

Pozornost je zaměřována na volné radikály a jejich úlohu v oxidačním stresu. Jedná se především o reaktivní kyslíkové (ROS) a dusíkové (NOS) radikály, které mohou působit na významné látky v těle (například lipidy či nukleové kyseliny), modifikovat je a důsledkem tohoto působení může být poškození významných funkcí v organismu (Paulová *et al.*, 2004). Pro měření antioxidační aktivity látek jsou používány zejména metody využívající radikály ABTS, DPPH a metoda ORAC.

#### 2.4.3.1 Metoda DPPH

V dnešní době je používán modifikovaný postup, který představil Blois (1958) a je založen na eliminaci syntetických radikálů. Touto metodou lze spektrofotometricky měřit antioxidační účinky extraktů i silic máty. Principem metody je přerušení radikálové řetězové reakce. V přítomnosti antioxidantu dochází k redukci tmavě fialového 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylového (DPPH<sup>•</sup>) radikálu za vzniku bezbarvé neutrální molekuly 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazinu (Obr. 12). Pro provedení měření je připravován roztok DPPH radikálu v ethanolu. Jako standard bývá využíván syntetický antioxidant trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina); (Brand-Williams *et al.*, 1995).



Obr. 12 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.

Úbytek radikálu je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Úbytek absorbance je přímo úměrný antioxidační schopnosti analyzované látky. Pro stanovení antioxidační aktivity látek je nejčastěji využíván výpočet hodnoty IC<sub>50</sub>. Tato veličina udává množství dané látky, které je schopné redukovat 50% DPPH radikálů. Radikálová aktivita může být také vyjádřena jako ekvivalent standardu troloxu.

#### **2.4.3.2 Metoda ABTS**

Metoda je založena na eliminaci radikálů ABTS (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát). Antioxidanty působí jako donory vodíku a redukují radikály. Měření je spektrofotometrické a je sledován úbytek radikálů. Jako standard je využíván antioxidant trolox a měření probíhá při vlnové délce 734 nm. Antioxidační schopnost analyzované látky je stanovována jako ekvivalent antioxidační schopnosti standardu troloxu (Paulová *et al.*, 2004). Metoda je také označována názvem TAEC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

#### **2.4.3.3 Metoda ORAC**

Fluorescenční metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je založena na schopnosti látek eliminovat kyslíkaté radikály, které jsou cíleně generované v průběhu analýzy. Látky, které mají antioxidační vlastnosti, zastavují radikálové reakce. Pro produkci peroxylových radikálů je používán AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid). Jako standard bývá využíván syntetický antioxidant trolox. Nutné je použití fluorescenční próby, kterou je například fluorescein. Produkované peroxylové radikály snižují fluorescenční signál oxidací próby. Antioxidanty snižují inhibici tohoto signálu vylučováním radikálů. Je vykreslována křivka fluorescenčního signálu a plocha pod touto křivkou slouží ke kvantifikaci antioxidační aktivity, může být například srovnávána s plochou pod křivkou standardu troloxu (Paulová *et al.*, 2004).

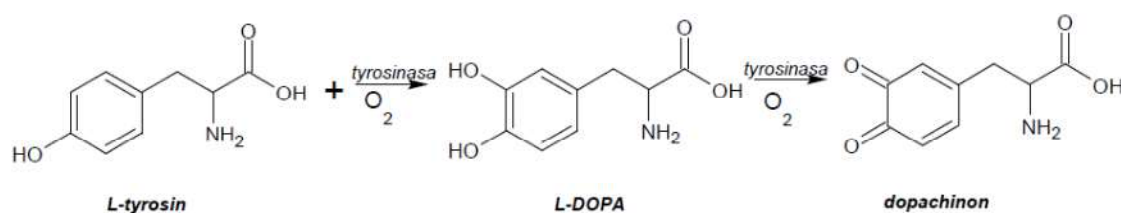
#### **2.4.4 Inhibice enzymu tyrosinasy**

Tyrosinasa je významným enzymem řazeným do třídy oxidas. Jedná se o multifunkční glykosylovaný enzym obsahující měď. Tento enzym je přítomný u hub, vyšších rostlin i živočichů (Chen *et al.*, 2003). Hraje klíčovou roli v melanogenezi živočichů a v enzymatickém hnědnutí ovoce a hub. Tyrosinasa odpovídá za biosyntézu tmavého makromolekulárního pigmentu melaninu, který chrání lidskou kůži před škodlivými

účinky UV záření. Melanin odpovídá za barvu lidské kůže, vlasů a očí. Je syntetizován melanocyty ve specializovaných organelách zvaných melanosomy.

Úvodní sled reakcí během melanogeneze je katalyzován enzymem tyrosinásou. Biosyntetická cesta tvorby melaninu vychází z aminokyseliny L-tyrosinu. V prvním kroku dochází k hydroxylaci L-tyrosinu za vzniku L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA), který je následně oxidován na dopachinon (Obr. 13). Enzym tyrosinasa se podílí na katalýze těchto dvou reakcí.

Tyrosinasa může způsobovat nežádoucí hyperpigmentaci lidské kůže, proto je pozornost zaměřena na zkoumání látek se schopností inhibovat tento enzym. Tyto inhibitory mají široké uplatnění v medicíně, v potravinářském a kosmetickém průmyslu (Chang, 2009). Jejich zástupcem jsou například kojová kyselina či arbutin. Tyrosinasa ovlivňuje kromě tvorby melaninu také vznik neuromelaninu, což je látka strukturně podobná melaninu nacházející se v mozku. Neuromelanin je stejně jako melanin syntetizován z L-DOPA. Abnormality spojené s tvorbou melaninu mohou vyústit ve vznik melanomů - rakoviny kůže. Naopak abnormality spojené se syntézou neuromelaninu mohou podpořit rozvoj některých neurodegenerativních onemocnění, například Parkinsonovy choroby. L-DOPA je také prekurzorem významného neurotransmiteru dopaminu. Poškození dopaminových drah může vést ke vzniku Parkinsonovy choroby. Základní látkou pro léčbu této choroby je L-DOPA. Cílem použití L-DOPA je zvýšení hladiny dopaminu v těle (Greggio *et al.*, 2005).



Obr. 13 Úvodní kroky biosyntézy melaninu katalyzované tyrosinásou.

### 2.4.4.1 Stanovení antityrosinasové aktivity

V dnešní době je pro měření inhibiční aktivity látek vůči enzymu tyrosinasa používán modifikovaný postup, který představil Tomita (1990). Jedná se o spektrofotometrickou metodu, která je založena na měření úbytku produktu oxidace tyrosinu - dopachinonu. Pokud má analyzovaná látka antityrosinasovou aktivitu, enzym je inhibován a vzniká menší množství dopachinonu. Pro měření je používána houbová tyrosinasa. Reakční směs obsahuje fosfátový pufr, houbovou tyrosinasu a látku s inhibičními vlastnostmi (standard či analyzovanou látku). Jako standard je používána kyselina kojová, která inhibuje tyrosinasu. Směs je inkubována při laboratorní teplotě a poté je do ní přidán enzymový substrát L-DOPA (L-3,4-dihydroxyfenylalanin) a směs je opět inkubována. Následně je měřena absorbance směsi při vlnové délce 492 nm.

Pro měření je nutné použití pozitivní kontroly (standardu) a negativní kontroly. Směs pro negativní kontrolu neobsahuje standard ani analyzovanou látku. Inhibiční aktivita analyzované látky se stanovuje následujícím způsobem:

$$\text{Inhibiční aktivita (\%)} = [(A_s - A_a) / A_s] * 100$$

$A_s$ ...absorbance negativní kontroly

$A_a$ ...absorbance směsi obsahující analyzovanou látku

Po vypočítání inhibiční aktivity je spočítána hodnota  $IC_{50}$ , tedy koncentrace analyzované látky nutná k dosažení 50% inhibice aktivity tyrosinasy. Antityrosinasová aktivita může být zjišťována jak pro extrakty máty, tak i pro izolované silice. Silice máty jsou převedeny do vhodného organického rozpouštědla, nejčastěji do dimethylsulfoxidu.

## **3 Experimentální část**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Chemikálie**

2,4-dinitrofenylhydrazin (Acros organics, Belgie)

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lach-ner, Česká republika)

Dimethyl sulfoxid (Merck, USA)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-ner, Česká republika)

DPPH (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol, pro UV spektroskopii, 99,8% (Lach-ner, Česká republika)

Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)

Hexahydrát chloridu hlinitého (Lach-ner, Česká republika)

Hexan (Sigma-Aldrich, USA)

Hydroxid draselný (Lach-ner, Česká republika)

Hydroxid sodný (Lach-ner, Česká republika)

Kvercetin (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina kojová (Sigma-Aldrich, USA)

L-DOPA (Sigma-Aldrich, USA)

Methanol, čistota p.a. (Sigma-Aldrich, USA)

Naringenin (Sigma-Aldrich, USA)

Octan draselný (VWR, USA)

Trolox (Sigma-Aldrich, USA)

Tyrosinasa (Sigma-Aldrich, USA)

Uhličitan sodný bezvodý (Lach-ner, Česká republika)

### 3.1.2 Biologický materiál

Pro experimenty bylo zvoleno 13 genotypů máty:

*Mentha piperita citrata* L. (Česká republika)

*Mentha longifolia* L. (Slovensko)

*Mentha piperita* L. (Česká republika)

*Mentha pulegium* L. (Slovinsko)

*Mentha spicata* L. (Německo)

*Mentha cervina* L. (Německo)

*Mentha villosa* L. (Česká republika)

*Mentha aquatica* L. (Česká republika)

*Mentha piperita citrata* 'Bergamotova' L. (Česká republika)

*Mentha arvensis* L. (Slovensko)

*Mentha piperita* cv. 'Perpeta' L. (Česká republika)

*Mentha microphylla* L. (Česká republika)

*Mentha suaveolens* L. (Česká republika)

Rostlinný materiál byl vypěstován na experimentálních plochách Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. (VÚRV, v.v.i.). Sběr byl proveden v září 2018 a rostliny byly vysušeny za kontrolovaných podmínek do konstantní hmotnosti.

### 3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Radwag váhy, Česká republika)

Kulový mlýn (Retsch, Česká republika)

Kyvety (VWR, USA)

Mikrocentrifuga Mikrospin 12 (Biosan, Litva)

pH metr CX-505 (Elmetron, Polsko)

Pipety (Eppendorf, Německo)

Plynový chromatograf Agilent 7800A s hmotnostní detektorem 5975C (Agilent technologies, USA)

Spektrofotometr UV/VIS S-20 (Boeco Germany, Německo)

Ultrazvuková čistička (Bandelin, Německo)

Ultrazvuková čistička s ohřevem (Bandelin, Německo)

Vakuový koncentrátor (Labconco, USA)

Vodní termostat B-490 (Buchi, Švýcarsko)

Vortex (Velp scientifica, Itálie)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Izolace silic máty**

Izolace silic z rostlinného materiálu byla provedena s využitím metody hydrodestilace. Hmotnost rostlinného materiálu každého genotypu byla 30 g a toto množství bylo umístěno do varné baňky s 500 ml destilované vody. Pro hydrodestilaci byla použita aparatura Clevengerova typu a destilace probíhala po dobu dvou hodin. Pro každý genotyp byla hydrodestilace provedena ve dvou opakováních. Získané silice byly odebrány do vialek a byly uchovávány při teplotě 4°C pro další experimenty. Objemy silic byly zaznamenány a byly spočítány koeficienty výtěžnosti. Pro následnou analýzu (identifikaci a kvantifikaci složek) byly připraveny vzorky 50 µl silic v 1 ml hexanu.

### **3.2.2 Metoda headspace**

Přibližně 5 g suchého rostlinného materiálu každého genotypu máty bylo umístěno do vialek, které byly uzavřeny krimpovacími uzávěry se septem. Byla provedena analýza headspace, tedy složení plynu nad vzorkem, s využitím plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS).

### **3.2.3 Analýza silic a headspace máty s využitím metody GC-MS a identifikace jejich složek**

Pro analýzu silic a headspace máty byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS). Podmínky analýzy byly následující: typ použité kolony byl Agilent HP-5MS, stacionární fáze byl 5% fenyl methyl siloxan. Parametry kolony byly délka 30 m; průměr 0,25 mm a tloušťka filmu 0,25 µm.



Dávkovaný objem vzorku byl 1  $\mu$ l. Splitovací poměr byl 5:1. Průtok plynu byl 1,1 ml/min. Teplotní program byl 60-300°C s nárůstem 3°C za minutu. Teplota hmotnostního detektoru byla 230°C, rozsah měření  $m/z$  byl 40-550. Identifikace a kvantifikace složek obsažených v silicích a headspace byla realizována s využitím softwaru Massfinder 4.51 a porovnáním s literaturou (Adams, 2007) na základě retenčních indexů jednotlivých složek a také na základě hmotnostních spekter.

### **3.2.4 Příprava rostlinných extraktů**

Pro další experimenty byly připraveny methanolické extrakty máty. Suchý rostlinný materiál byl homogenizován pomocí kulového mlýnu. Byly připraveny vzorky v triplikátech pro každý genotyp máty. Do mikrozkušavek typu Eppendorf bylo naváženo přibližně 100 mg homogenizovaného materiálu, navážky byly zaznamenány a rostlinný materiál byl extrahován do 1 ml 80% methanolu. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové vany a poté byla extrakce znovu zopakována s dalším podílem 80% methanolu (1 ml). Následně byly mikrozkušavky umístěny na vakuový koncentrátor Centrivap k odpaření dosucha a poté byly přidány 2 ml methanolu (čistota p.a.). Vzorky byly pro následnou analýzu uchovávány při 4°C.

### **3.2.5 Analýza fenolických složek rostlinných extraktů**

Byla provedena kvantifikace celkových fenolů, flavonolů a flavononů v rostlinách máty s využitím tří spektrofotometrických metod. Pro analýzu fenolických složek byly připraveny následující roztoky: 1% roztok 2,4-dinitrofenylhydrazinu (400,07 mg 2,4-dinitrofenylhydrazinu bylo rozpuštěno ve směsi 40 ml 99,8% ethanolu a 2 ml 35% HCl); 1% roztok hydroxidu draselného v 70% methanolu; 2% roztok chloridu hlinitého v destilované vodě; roztok kvercetinu (1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v ethanolu (99,8%); roztok kyseliny gallové o koncentraci 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (10 mg kyseliny gallové bylo rozpuštěno v 1 ml ethanolu a poté byl objem doplněn do 10 ml destilovanou vodou); roztok naringeninů (1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v methanolu; vodný roztok octanu draselného (1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); 20% vodný roztok uhličitanu sodného a Folin-Ciocalteuovo činidlo (smíšené 1:2 s destilovanou vodou).

### 3.2.5.1 Stanovení celkových fenolů metodou Folin-Ciocalteu

Obsah celkových fenolů v rostlinných extraktech byl stanoven spektrofotometrickou metodou Folin-Ciocalteu. Metoda pro stanovení celkových fenolů v extraktech máty vycházela ze studií, které provedli Singleton a Rossi (1965); Waterhouse (2003). Použitý postup byl optimalizován s využitím poznatků uvedených v těchto studiích. Jako standard byla využita kyselina gallová. Byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové o koncentracích 25; 50; 75; 100; 250; 500 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ředěním základního roztoku ( $c = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) destilovanou vodou. Pro měření byly využity dvě koncentrace extraktů (10 a 25  $\mu\text{l}$ ) dle obsahu fenolů v jednotlivých vzorcích, v závislosti na rozmezí kalibrační křivky kyseliny gallové. Do odměrné baňky bylo napipetováno 5 ml destilované vody a k tomuto množství bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  jednotlivých roztoků kyseliny gallové (v případě kalibrační řady) nebo v případě vzorků 10 či 25  $\mu\text{l}$  methanolických extraktů. Do baňky bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  naředěného roztoku Folin-Ciocalteu (1:2 s destilovanou vodou). Po 5 minutách bylo přidáno 1,5 ml 20% roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a vzorky byly doplněny do 10 ml destilovanou vodou. Vzorky byly inkubovány po dobu 2 hodin ve tmě při laboratorní teplotě a poté byla změřena jejich absorbance při vlnové délce 765 nm proti blanku, kterým byla destilovaná voda. Měření probíhalo vždy v triplicátech pro jednotlivé genotypy máty.

### 3.2.5.2 Stanovení flavonolů kolorimetrickou metodou s $\text{AlCl}_3$

Kvantifikace flavonolů byla provedena pomocí kolorimetrické metody s chloridem hlinitým. Metoda pro stanovení flavonolů byla optimalizována s využitím poznatků uvedených ve studiích, které provedli Nagy a Grančai (1996); Woisky a Salatino (1998). Jako standard byl využit flavonol kvercetin. Kalibrační řada kvercetinu obsahovala roztoky o koncentracích 1; 5; 10; 25 a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , které vznikly ředěním základního roztoku kvercetinu o koncentraci 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  destilovanou vodou. Kalibrační řada byla připravena do kyvet smícháním 500  $\mu\text{l}$  zředěného standardu kvercetinu, 500  $\mu\text{l}$  2% roztoku  $\text{AlCl}_3$  a 200  $\mu\text{l}$  roztoku octanu draselného ( $c = 1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Blank sestával z 500  $\mu\text{l}$  destilované vody, 500  $\mu\text{l}$  2% roztoku  $\text{AlCl}_3$  a 200  $\mu\text{l}$  roztoku octanu draselného. Vzorky byly připraveny obdobně jako blank s tím rozdílem, že výsledný objem extraktu a destilované vody v kyvetě byl 500  $\mu\text{l}$ . Pro měření byly použity tři objemy extraktů (10, 25 a 50  $\mu\text{l}$ ) v závislosti na obsahu flavonolů v jednotlivých genotypech máty. Použité množství extraktu bylo doplněno do 500  $\mu\text{l}$

destilovanou vodou. Kyvety byly inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 415 nm proti blanku. Měření probíhalo v triplikátech.

### **3.2.5.3 Stanovení flavononů kolorimetrickou metodou s 2,4-DNPH**

Flavonony byly v extraktech máty kvantifikovány kolorimetrickou metodou s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Postup pro stanovení flavononů vycházel z poznatků uvedených ve studiích, které provedli Nagy a Grančai (1996); Woisky a Salatino (1998). Jako standard byl využit flavonon naringenin. Byly připraveny roztoky naringeninu o koncentracích 200; 400; 600; 800 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ředěním základního roztoku naringeninu o koncentraci 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  destilovanou vodou. Kalibrační řada byla připravena do zkumavek a sestávala z 500  $\mu\text{l}$  1% roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu, 500  $\mu\text{l}$  čistého methanolu a 250  $\mu\text{l}$  naředěného standardu. Blank byl připraven smícháním 500  $\mu\text{l}$  1% roztoku 2,4-DNPH, 500  $\mu\text{l}$  čistého methanolu a 250  $\mu\text{l}$  destilované vody. Vzorky sestávaly z 500  $\mu\text{l}$  1% roztoku 2,4-DNPH, 500  $\mu\text{l}$  čistého methanolu, 150  $\mu\text{l}$  destilované vody a 100  $\mu\text{l}$  methanolického extraktu máty. Zkumavky byly inkubovány po dobu 50 minut při teplotě 50°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo ke směsi přidáno 1,25 ml 1% roztoku KOH v 70% methanolu a zkumavky byly inkubovány po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Z každé zkumavky bylo odebráno 500  $\mu\text{l}$  směsi do kyvety, k tomuto množství bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  čistého methanolu a následně byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 495 nm proti blanku. Měření probíhalo vždy v triplikátu pro každý genotyp máty.

### **3.2.6 Stanovení antioxidační aktivity extraktů a silic**

Antiradikálová aktivita silic a extraktů máty byla zkoumána s využitím metody DPPH. Původní metodu pro stanovení antiradikálové aktivity představil Blois (1958). Postup, který byl použit v této práci, vycházel z původní studie (Blois, 1958) a dále z modifikovaných postupů, které představili ve svých studiích Čavar *et al.* (2008); Brand-Williams *et al.* (1995); Bondet *et al.* (1997). Pro stanovení aktivity silic máty byly připraveny roztoky v dimethylsulfoxidu (DMSO), které obsahovaly 50  $\mu\text{l}$  silice v 950  $\mu\text{l}$  DMSO. Pro měření byl použit roztok DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylového radikálu) v ethanolu (99,8%). Základní roztok DPPH o koncentraci  $5,25 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl zředěn ethanolem tak, aby výsledná absorbance

tohoto roztoku byla rovná přibližně 1. Roztok DPPH byl připravován denně a mezi jednotlivými měřeními byl uchovávan ve tmě při 4°C. Jako standard byl využit syntetický antioxidant trolox. Byl připraven základní roztok troloxu v ethanolu (99,8%) o koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Poté byla připravena kalibrační řada troloxu o koncentracích 0,100; 0,075; 0,050; 0,025 a 0,010 mg.ml<sup>-1</sup> ředěním základního roztoku troloxu o koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup> ethanolom (99,8%).

Měření bylo založeno na stanovení úbytku DPPH radikálu v přítomnosti antioxidantu. Měření kalibrační řady probíhalo v triplikátech pro jednotlivé roztoky. Každá kyveta obsahovala po 1 ml DPPH roztoku, zaznamenala se hodnota absorbance při vlnové délce 517 nm a poté do ní bylo přidáno po 50 µl roztoku standardu. Kyvety byly inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a následně byla zaznamenána výsledná hodnota absorbance. Měření antioxidační aktivity extraktů probíhalo obdobně. Nejprve byly pro měření využívány původní extrakty, z důvodu vysoké antioxidační aktivity byly posléze extrakty ředěné 50x methanolem (p.a.). K 1 ml DPPH roztoku bylo přidáváno 50 µl 50x zředěného extraktu a byl zjišťován úbytek absorbance. Ke stanovení antioxidační aktivity silic byly využity dvě koncentrace silic máty z důvodu rozdílné aktivity silic jednotlivých genotypů. K 1 ml DPPH roztoku bylo přidáváno 100 či 150 µl roztoku silice v DMSO (v závislosti na antioxidační aktivitě silice a rozsahu kalibrační křivky troloxu) a byla zaznamenána změna absorbance po 30 minutách. Měření pro silice a extrakty máty probíhalo pro každý genotyp v triplikátu.

### **3.2.7 Stanovení antityrosinasové aktivity extraktů a silic**

Stanovení účinku silic a methanolických extraktů máty na inhibici tyrosinasy bylo provedeno modifikovaným postupem představeným Saghaiem *et al.* (2013). Pro měření byl připraven roztok substrátu tyrosinasy L-DOPA (3,4-dihydroxyfenylalaninu) o koncentraci 0,85 mmol.l<sup>-1</sup> a roztok tyrosinasy o koncentraci 46,5 U.ml<sup>-1</sup>. Součástí reakční směsi byl fosfátový pufr o pH 6,8; který byl připraven rozpuštěním 3,505 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O a 1,593 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O v 800 ml destilované vody. Tento roztok byl upraven na pH 6,8 pomocí roztoků NaOH a HCl a následně byl doplněn do 1 l destilovanou vodou. Jako standard byla využita kyselina kojová. Základní roztok kyseliny kojové měl koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Kalibrační řada sestávala z roztoků

o koncentracích 0,100; 0,075; 0,050; 0,025; 0,010; 0,0075 a 0,0050 mg.ml<sup>-1</sup> připravených ředěním základního roztoku kyseliny kojové.

Antityrosinasaová aktivita byla stanovena měřením úbytku produktu přeměn substrátu L-DOPA tyrosinase spektrofotometricky při vlnové délce 492 nm (Tab. 1). Antityrosinasaová aktivita byla stanovována pro standard (kyselinu kojovou), původní neředěné extrakty máty a pro roztoky silic v DMSO. Reakční směs sestávala z fosfátového pufru; enzymu tyrosinasy; inhibitoru (standardu, extraktu či silice) a substrátu (L-DOPA). Daný objem pufru, enzymu a inhibitoru byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo do směsi přidáno dané množství substrátu, směs byla inkubována po dobu 20 minut a absorbance roztoku se stanovovala při vlnové délce 492 nm. Pro kalibraci spektrofotometru byl použit blank tvořený fosfátovým pufrem a tyrosinase. Kromě blanku byl pro každý vzorek (obsahující extrakt či silici) připraven i slepý vzorek, který neobsahoval substrát. Absorbance slepých vzorků pro jednotlivé extrakty i silice máty byly zaznamenány. Pro stanovení antityrosinasaové aktivity byly následně vypočítány rozdíly mezi absorbancemi slepých vzorků a vzorků obsahujících extrakty či silice daného genotypu.

Tab. 1 Postup pro stanovení antityrosinasaové aktivity extraktů a silic máty. Blank sloužil ke kalibraci přístroje. Byla zjištěna antityrosinasaová aktivita standardu (kyseliny kojové), extraktů a silic máty. Pro každou reakční směs obsahující extrakt či silici byl připraven slepý vzorek, jehož absorbance byly rovněž zaznamenány. Slepý vzorek neobsahoval substrát (L-DOPA).

	<b>Pufr</b>	<b>Tyrosinasa</b>	<b>Kojová kyselina</b>	<b>Extrakt</b>	<b>Silice v DMSO</b>	<b>L-DOPA</b>
				[μl]		
<b>Blank</b>	800	200	-	-	-	-
<b>Standard</b>	600	200	100	-	-	100
<b>Slepý vzorek pro směs s extraktem</b>	700	200	-	100	-	-
<b>Směs s extraktem</b>	600	200	-	100	-	100
<b>Slepý vzorek pro směs se silicí</b>	790	200	-	-	10	-
<b>Směs se silicí</b>	690	200	-	-	10	100

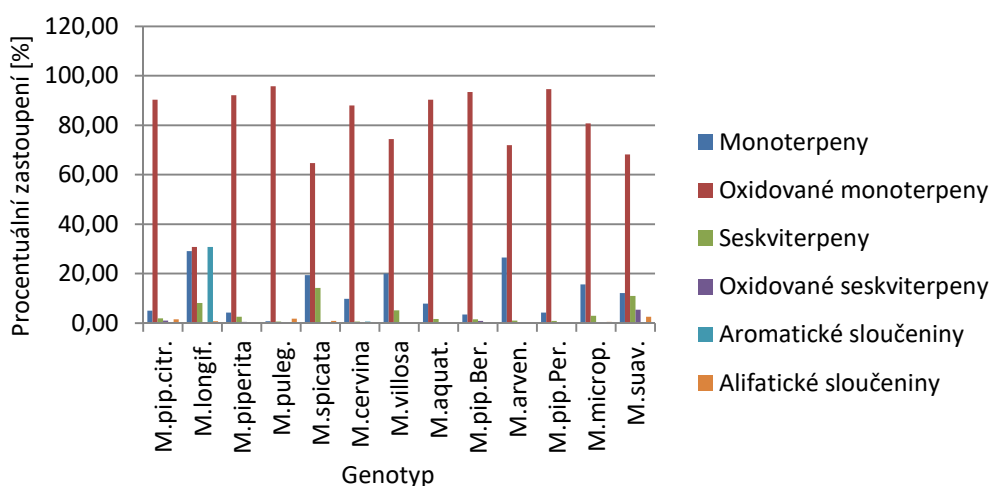
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Izolace silic, identifikace a kvantifikace jejich složek

Jedním z cílů bakalářské práce bylo izolovat silice z 13 vybraných genotypů máty a identifikovat jejich složky. S využitím metody hydrodestilace byly izolovány silice z přibližně 30 g rostlinného materiálu. Objemy vzniklých silic se pohybovaly v rozmezí od 0,14 do 0,98 ml. Byly spočítány koeficienty výtěžnosti izolace, které se nacházely v intervalu od 0,45 do 3,23 %.

Analýza silic byla provedena s využitím plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. K identifikaci složek silic byl využit software Massfinder 4.51 a literatura (Adams, 2007), složení bylo určeno na základě porovnávání retenčních indexů jednotlivých sloučenin a hmotnostních spekter. Celkově bylo identifikováno 64 sloučenin vyskytujících se v silicích máty. Byla sestavena tabulka složení silic jednotlivých genotypů máty (Tab. 2). V tabulce jsou uvedeny názvy jednotlivých sloučenin, jejich procentuální zastoupení v silicích, průměr retenčních indexů daných látek v příslušných silicích a retenční indexy pro dané látky uvedené v literatuře (Adams). Zastoupené sloučeniny byly klasifikovány do 6 tříd dle jejich chemické povahy na monoterpeny, oxidované monoterpeny (například aldehydy či ketony), seskviterpeny, oxidované seskviterpeny, aromatické a alifatické látky (Obr. 14).

### Klasifikace složek silic



Obr. 14 Klasifikace složek silic dle jejich chemické povahy do šesti tříd a procentuální zastoupení těchto tříd zastoupených v silicích máty.

Tab. 2 Kvantifikace složek silic zkoumaných genotypů máty s uvedenými retenčními indexy jednotlivých sloučenin. Genotypy: MPC = *M. piperita citrata*; ML = *M. longifolia*; MPI = *M. piperita*; MPU = *M. pulegium*; MSP = *M. spicata*; MC = *M. cervina*; MV = *M. villosa*; MA = *M. aquatica*; MPB = *M. piperita Bergamotova*; MAR = *M. arvensis*; MPP = *M. piperita Perpetua*; MM = *M. microphylla*; MSU = *M. suaveolens*. V tabulce jsou zvýrazněny vždy 3 majoritní složky silice jednotlivých genotypů máty; červenou barvou je vyznačena nejvíce zastoupená sloučenina, zelenou a žlutou barvou jsou vyznačeny 2. a 3. nejvíce zastoupené sloučeniny.

				<i>MPC</i>	<i>ML</i>	<i>MPI</i>	<i>MPU</i>	<i>MSP</i>	<i>MC</i>	<i>MV</i>	<i>MA</i>	<i>MPB</i>	<i>MAR</i>	<i>MPP</i>	<i>MM</i>	<i>MSU</i>
	Složka	RI	RI A.	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1	$\alpha$ -thujen	925	924		2,7											
2	$\alpha$ -pinen	932	932	0,2	1,2	0,6	0,3	1,3	0,8	0,7	2,0		1,2	0,6	0,9	1,0
3	kamfen	947	946								0,4					
4	sabinen	972	969	0,5	2,4	0,5		1,2	0,4	0,6	1,5		1,0	0,5	0,8	0,6
5	$\beta$ -pinen	976	974	0,5	2,0	0,9	0,3	2,3	1,3	0,8	3,1		7,9	1,1	1,7	2,6
6	myrcen	990	988	1,2	2,5	0,2		10,3	0,5	0,7	0,7	1,1	0,5	0,4	1,1	1,1
7	3-oktanol	995	988				1,8	0,5		0,4				0,2	0,6	
8	$\alpha$ -terpinen	1016	1014		3,7	0,2										
9	<i>p</i> -cymene	1024	1020		9,7											
10	limonen	1028	1024	0,7		1,4	0,3	1,7	6,9	16,4		0,4	15,2	1,5	10,1	4,9
11	eukalyptol	1031	1026	5,2	26,2	5,9		12,0		3,1	23,7	1,3	1,4	4,1	6,7	
12	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimen	1036	1032	0,7	1,5			2,2		1,0		0,6	0,4	0,3	0,9	2,1
13	<i>E</i> - $\beta$ -ocimen	1046	1044	0,7								1,0	0,3		0,3	
14	$\gamma$ -terpinen	1057	1054	0,2	13,1	0,4					0,2					
15	<i>cis</i> -sabinen hydrát	1065	1065		0,6	1,4							0,3	0,2		
16	fenchon	1087	1083						0,4	0,8						
17	terpinolen	1087	1086	0,3				0,4				0,3				
18	linalool	1102	1095	33,0		3,0		0,3			0,6	45,9	0,6		0,9	
19	okt-1-en-3-yl acetát	1112	1110	0,5								0,3				2,6
20	oktan-3-yl acetát	1123	1120	1,0	0,8			0,3								
21	menthon	1157	1148			7,0	12,0		12,9		10,6		0,5	36,7		
22	menthofuran	1165	1159			16,0	11,7				52,9			21,2		
23	$\delta$ -terpineol	1165	1162		0,8			0,5								
24	menthol	1167	1167											6,1		
25	terpinen-4-ol	1177	1174	0,3	0,3	0,6							0,4	0,4		

Tab. 2 Kvantifikace složek silic zkoumaných genotypů máty s uvedenými retenčními indexy jednotlivých sloučenin. Genotypy: MPC = *M. piperita citrata*; ML = *M. longifolia*; MPI = *M. piperita*; MPU = *M. pulegium*; MSP = *M. spicata*; MC = *M. cervina*; MV = *M. villosa*; MA = *M. aquatica*; MPB = *M. piperita Bergamotova*; MAR = *M. arvensis*; MPP = *M. piperita Perpetua*; MM = *M. microphylla*; MSU = *M. suaveolens*. V tabulce jsou zvýrazněny vždy 3 majoritní složky silice jednotlivých genotypů máty; červenou barvou je vyznačena nejvíce zastoupená sloučenina, zelenou a žlutou barvou jsou vyznačeny 2. a 3. nejvíce zastoupené sloučeniny (pokračování).

	Složka	RI	RI A.	MPC %	ML %	MPI %	MPU %	MSP %	MC %	MV %	MA %	MPB %	MAR %	MPP %	MM %	MSU %
26	isomenthol	1177	1179			44,5								16,6		
27	neoisomenthol	1185	1184			1,6	2,6							0,3		
28	$\alpha$ -terpineol	1190	1186	5,2	2,1	0,5		0,5			1,5	5,8	0,6		1,0	
29	dihydrokarvon	1199	1200							8,9			6,2		17,2	
30	1-methoxy-3-methyl-2-vinylbenzen	1219	1219						0,6							
31	rodinol	1228	1223		0,4											
32	nerol	1228	1227	0,7								1,1				
33	pulegon	1240	1233			0,5	68,6		38,2		1,2		2,8	4,9		
34	karvon	1247	1239							59,4			55,6		53,8	2,7
35	piperiton	1253	1249			0,5			6,9	0,6			0,7	0,9		
36	linalyl acetát	1257	1254	29,1		2,6						34,0			0,5	
37	karvon epoxid	1261	1259					0,5								
38	1-dekanol	1272	1266										0,4			
39	neomentyl acetát	1274	1271			0,3	0,5							1,1		
40	thymol	1295	1289		19,5											
41	mentyl acetát	1294	1294			6,2								2,1		
42	karvakrol	1302	1298		0,9											
43	isomentyl acetát	1307	1304			0,4										
44	isodihydrokarveol acetát	1328	1326							1,6					0,7	
45	piperitenon	1339	1340				0,5		29,6				3,0			



Tab. 2 Kvantifikace složek silic zkoumaných genotypů máty s uvedenými retenčními indexy jednotlivých sloučenin. Genotypy: MPC = *M. piperita citrata*; ML = *M. longifolia*; MPI = *M. piperita*; MPU = *M. pulegium*; MSP = *M. spicata*; MC = *M. cervina*; MV = *M. villosa*; MA = *M. aquatica*; MPB = *M. piperita Bergamotova*; MAR = *M. arvensis*; MPP = *M. piperita Perpetua*; MM = *M. microphylla*; MSU = *M. suaveolens*. V tabulce jsou zvýrazněny vždy 3 majoritní složky silice jednotlivých genotypů máty; červenou barvou je vyznačena nejvíce zastoupená sloučenina, zelenou a žlutou barvou jsou vyznačeny 2. a 3. nejvíce zastoupené sloučeniny (pokračování).

				<i>MPC</i>	<i>ML</i>	<i>MPI</i>	<i>MPU</i>	<i>MSP</i>	<i>MC</i>	<i>MV</i>	<i>MA</i>	<i>MPB</i>	<i>MAR</i>	<i>MPP</i>	<i>MM</i>	<i>MSU</i>
	Složka	RI	RI A.	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
46	α-terpineol acetát	1349	1346	13,8		1,2										
47	thymyl acetát	1353	1349		0,7											
48	nerol acetát	1364	1359	1,1								2,0				
49	piperitenon oxid	1373	1366		0,5			51,1								65,5
50	geranyl acetát	1384	1379	2,0								3,4				
51	β - bourbonen	1382	1387							0,4					0,8	
52	β-elemen	1391	1389					1,4								
53	(Z)-jasmon	1398	1392													2,6
54	isokaryofylen	1417	1417	1,0	4,7	1,1		3,3	0,7	1,5	0,9	1,0	1,1	0,5	1,3	1,1
55	cis-muurola-3,5-dien	1444	1448					0,6								
56	α-humulen	1450	1452		0,3											
57	(E-)β-farnesen	1452	1454					0,6								1,3
58	cis -kadina -1,4-dien	1460	1461					0,7								
59	γ-muurolen	1478	1478	1,0	3,2	1,5	0,6	5,0		3,3	0,5	0,5		0,4	0,9	8,6
60	bicyklogermakren	1494	1500					1,7								
61	isodaucen	1502	1500					0,5								
62	δ-kadinen	1522	1522					0,5			0,3					
63	elemol	1547	1548	1,1												
64	globulol	1588	1590			0,5						0,9				2,9
	Celkem identifikováno (%)			100,0	99,7	99,6	99,0	99,2	99,2	100,0	100,0	99,7	100,0	100,0	100,0	99,4

Složení silic jednotlivých genotypů máty bylo porovnáno s literaturou. Majoritní složku silic máty tvoří monoterpeny a seskviterpeny. Dle předpokladu byly v silicích majoritně zastoupeny deriváty monoterpenů (například laktony, aldehydy či ketony), což odpovídá literatuře (Brahmi *et al.*, 2017). Výjimku tvořila silice *M. longifolia*, která byla kromě monoterpenů a jejich derivátů tvořena aromatickými sloučeninami. Z předchozích studií vyplývá, že tato silice bývá majoritně složena z oxidovaných monoterpenů, ovšem složení závisí na geografickém původu rostliny. S výjimkou silice tohoto genotypu vykazovaly všechny majoritní obsah oxidovaných derivátů monoterpenů (více než 60 %), dalšími významnými složkami byly jednoduché monoterpeny skládající se z 10 uhlíků a seskviterpeny složené z 15 uhlíků. Nejvyšší obsah oxidovaných monoterpenů byl zjištěn u genotypu *M. pulegium* (95,8 %). Silice máty peprné (*M. piperita*; *M. piperita* 'Perpeta', *M. piperita* 'Bergamotova' a *M. piperita citrata*) se vyznačovaly vysokým obsahem oxidovaných monoterpenů (nad 90,4 %).

Silice *M. longifolia* vykazovala jako jediná odlišné složení, ve kterém nebyly majoritní složkou oxidované monoterpeny. Tato silice byla tvořena z 30,8 % oxidovaných monoterpenů; 30,8 % aromatických sloučenin a z 29,1 % monoterpenů. Aromatické sloučeniny byly přítomné pouze u silic *M. longifolia* a *M. cervina* (0,6 %). Nejméně byly v silicích zastoupeny oxidované seskviterpeny (vyskytovaly se pouze u 4 genotypů a jejich nejvyšší obsah v silici byl 5,4 %) a alifatické sloučeniny, jejichž nejvyšší obsah v silicích byl 2,6 %.

Téměř ve všech genotypech byly zastoupené jednoduché monoterpeny  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, limonen, sabinen a myrcen. Nejčastěji se v silicích máty vyskytovaly oxidované monoterpeny eukalyptol, menthon, menthofuran, isomenthol, pulegon, karvon, linalool, linalyl acetát, piperitenon a piperitenon oxid. V menší míře byly zastoupeny seskviterpeny (například isokaryofylen). Nejméně byly zastoupeny deriváty seskviterpenů, alifatické látky (3-oktanol; oktan-3-yl acetát) a aromatické látky (*p*-cymen).

Majoritními složkami silice *M. piperita citrata* (dříve užívaným názvem *M. aquatica citrata*) byly oxidované monoterpeny linalool (33,0 %), linalyl acetát (29,1 %) a  $\alpha$ -terpineol acetát (13,8 %), což odpovídá literatuře. Ve studiích je nejčastěji uváděno, že silice tohoto genotypu jsou bohaté na linalool a linalyl acetát (Lawrence, 1978;

Malizia *et al.*, 1996). Hlavními složkami silice *M. longifolia* byly oxidovaný monoterpen eukalyptol (26,2 %), aromatická sloučenina thymol (19,5 %) a jednoduchý monoterpen  $\gamma$ -terpinen (13,1 %). Thymol byl přítomný pouze u silice *M. longifolia*. Obecně u tohoto genotypu panuje nesoulad ve složení, majoritní složky se liší v závislosti na geografickém původu rostliny. Existuje velké množství genotypů *M. longifolia* a silice mohou obsahovat širokou řadu chemických sloučenin (Lawrence, 2007). Dle některých studií odpovídala složení silice majoritní sloučenina eukalyptol (Fleisher a Fleisher, 1998; Gavalas *et al.*, 1998), nejčastěji však byly nejvíce zastoupenými látkami v silici piperiton oxid, piperitenon oxid a karvon (Lawrence, 1978; Baser *et al.*, 1999; Maffei, 2007). V silici byl přítomný jen piperitenon oxid a tvořil pouze 0,5 % složení.

Dále byly zkoumány genotypy máty peprné (*M. piperita*, *M. piperita* 'Bergamotova' a *M. piperita* 'Perpeta'). Hlavními složkami silice *M. piperita* byly isomenthol (44,5 %), menthofuran a menthon. Tyto látky jsou klasifikovány jako oxidované monoterpeny. Majoritními složkami silice *M. piperita* 'Bergamotova' byly linalool (45,9 %), linalyl acetát a  $\alpha$ -terpineol. Silici *M. piperita* 'Perpeta' tvořily sloučeniny menthon (36,7 %), menthofuran a isomenthol a její složení bylo podobné genotypu *M. piperita*. Silice tří vybraných genotypů máty peprné byly složeny majoritně z oxidovaných monoterpenů a jejich složení odpovídalo studiím (Malingré, 1969; Lawrence, 2007). Silici *M. aquatica* (máty vodní) tvořil menthofuran (52,9 %), menthon a eukalyptol. Kvalitu silice ve všeobecnosti určuje obsah menthofuranu, který má být co nejnižší (Spilková *et al.*, 2016), z čehož vyplývá, že u 3 genotypů (*M. piperita*, *M. aquatica* a *M. piperita* 'Perpeta') má silice nižší kvalitu. Pokles obsahu mentholu a zvýšení obsahu menthofuranu je způsobené pozdním termínem sklizně. Nejvyšší obsah mentholu bývá v termínu plného kvetení, později obsah klesá (Vaverková *et al.*, 2009).

Majoritními složkami silice *M. pulegium* byly oxidované monoterpeny pulegon (68,6 %), menthon a menthofuran. Pulegon byl také majoritní složkou silice *M. cervina* (38,2 %). Pulegon se komerčně využívá ve sprejích proti parazitům domácích zvířat, zejména jako repelent proti blechám (Poppenga a Oehme, 2010) a testuje se jeho účinnost proti skladištním škůdcům (Golden *et al.*, 2018). Silice *M. spicata* byla složena z oxidovaných monoterpenů piperitenon oxidu (51,1 %), eukalyptolu a jednoduchého monoterpenu myrcenu. Složení silice, ve kterém převažují oxidované monoterpeny, odpovídá literatuře (Baser *et al.*, 1999; Lawrence, 1978). Jako významná složka silice

genotypu *M. spicata* je také uváděn karvon (Koyalta *et al.*, 1993), který se ovšem ve zkoumané silici nevyskytoval. Majoritní složkou silic *M. villosa*, *M. arvensis* a *M. microphylla* byl oxidovaný monoterpen karvon. Tato skutečnost byla zaznamenána i v literatuře (Lawrence, 1978; Malingré, 1969). Silice byly tvořeny zejména oxidovanými monoterpeny a monoterpeny jednoduchými. Posledním zkoumaným genotypem byl *M. suaveolens*. Hlavní složkou silice byl piperitenon oxid (65,5 %) a silice obsahovala nejvyšší množství  $\gamma$ -muurolenu ze všech genotypů máty (8,6 %). Složení těchto silic odpovídalo studiím (Lawrence, 1978).

Vzhledem k složení silic vybraných genotypů jsou komerčně zajímavé zejména silice s obsahem limonenu (z 13 hodnocených 5 – konkrétně *M. cervina*, *M. villosa*, *M. arvensis*, *M. microphylla* a *M. suaveolens*), který má příjemnou citronovou vůni a používá se v širokém spektru kosmetických a potravinářských výrobků, nebo se přidává k průmyslovým rozpouštědlům (Kim *et al.*, 2013). Další zajímavou skupinou jsou genotypy s majoritou eukalyptolu v silici (*M. longifolia*, *M. piperita*, *M. aquatica*), protože tato složka se používá ve farmaceutických přípravcích na léčbu zápalu a nemoci dýchacího ústrojí (Bhowal a Gopal, 2016).

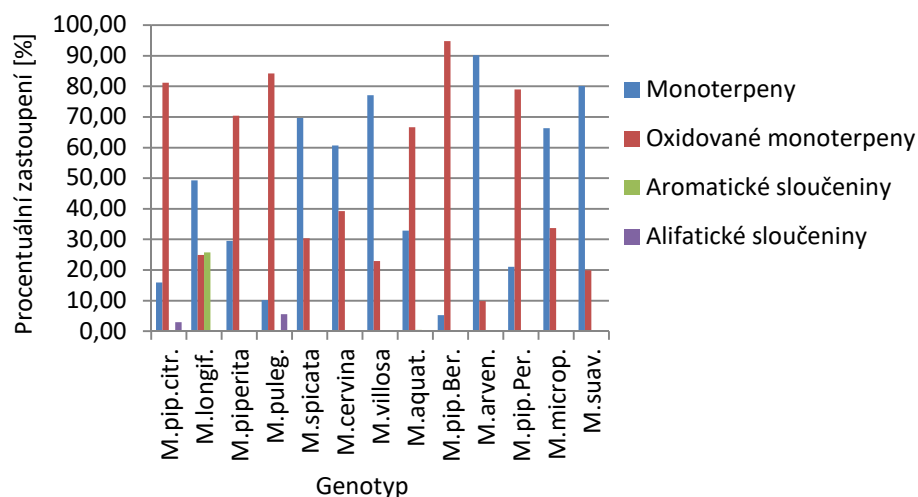
## 4.2 Kvantifikace složek headspace

Dalším z cílů bakalářské práce bylo identifikovat a kvantifikovat složky headspace, tedy určit složení plynné fáze nad vzorkem (suchým rostlinným materiálem). Analýzou headspace 13 genotypů máty bylo identifikováno celkem 31 sloučenin. Tyto látky byly opět klasifikovány dle chemické povahy. Bylo zjištěno, že v headspace nebyly přítomny žádné seskviterpeny ani jejich deriváty. Zastoupeny byly pouze monoterpeny a jejich deriváty, aromatické a alifatické sloučeniny.

Majoritními složkami headspace byly jednoduché monoterpeny a deriváty monoterpenů. Nejvyšší obsah oxidovaných monoterpenů byl stanoven u genotypu *M. piperita* 'Bergamotova' (94,8 %). Aromatické sloučeniny byly v headspace přítomny pouze u genotypu *M. longifolia* a byly zde zastoupeny ve větší míře (25,8 %), stejně jako u silice tohoto genotypu. Alifatické sloučeniny byly zastoupeny pouze u dvou genotypů – *M. piperita citrata* a *M. pulegium*, a to jen v malé míře (2,96 a 5,61 %).

Byla provedena identifikace složek headspace a jejich klasifikace do 4 tříd, byl sestaven graf klasifikace zastoupených složek (Obr. 15) a tabulka celkového složení headspace jednotlivých genotypů máty (Tab. 3).

### Klasifikace složek headspace



Obr. 15 Klasifikace složek headspace dle jejich chemické povahy do čtyř tříd a procentuální zastoupení těchto tříd zastoupených v headspace máty.

Tab. 3 Kvantifikace složek headspace zkoumaných genotypů máty s uvedenými retenčními indexy jednotlivých sloučenin. Genotypy: MPC = *M. piperita citrata*; ML = *M. longifolia*; MPI = *M. piperita*; MPU = *M. pulegium*; MSP = *M. spicata*; MC = *M. cervina*; MV = *M. villosa*; MA = *M. aquatica*; MPB = *M. piperita Bergamotova*; MAR = *M. arvensis*; MPP = *M. piperita Perpeta*; MM = *M. microphylla*; MSU = *M. suaveolens*. V tabulce jsou zvýrazněny vždy 3 majoritní složky headspace jednotlivých genotypů máty; majoritní složka headspace je vyznačena červenou barvou, 2. a 3. nejvíce zastoupené sloučeniny jsou vyznačeny zelenou a žlutou barvou.

				<i>MPC</i>	<i>ML</i>	<i>MPI</i>	<i>MPU</i>	<i>MSP</i>	<i>MC</i>	<i>MV</i>	<i>MA</i>	<i>MPB</i>	<i>MAR</i>	<i>MPP</i>	<i>MM</i>	<i>MSU</i>
	Složka	RI	RI A.	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1	$\alpha$ -thujen	934	924		11,6						0,3					
2	$\alpha$ -pinen	941	932	2,2	3,3	7,6	6,1	5,5	10,9	3,3	9,0		5,7	4,3	4,4	15,5
3	kamfen	956	946								1,5					
4	sabinen	982	969	3,7	4,9	4,3		3,9	3,2	2,2	5,3		3,2	2,0	3,2	4,8
5	$\beta$ -pinen	986	974	3,8	3,5	7,5		6,5	7,4	2,8	9,0		24,4	4,7	8,4	13,4
6	myrcen	999	988	3,4	6,1	1,9		43,7	3,2	3,1	1,8	2,9	2,1	2,0	4,9	9,2
7	3-oktanol	1003	988				5,6									
8	$\alpha$ -terpinen	1024	1014		4,1											
9	<i>p</i> -cymen	1031	1020		25,8						0,5					
10	limonen	1035	1024	1,5		8,3	4,1	5,9	35,9	63,2	6,1	2,4	53,8	8,0	43,4	29,4
11	eukalyptol	1037	1026	25,0	24,9	27,2		19,4		7,4	35,0	5,2	1,9	9,1	15,1	
12	(Z)- $\beta$ -ocimen	1043	1032	1,3	1,6			4,2		2,5			1,1		2,0	7,8
13	$\gamma$ -terpinen	1065	1054		14,1											
14	<i>cis</i> -sabinen hydrát	1073	1065			2,2										
15	linalool	1107	1095	23,4		2,6		1,4			0,2	40,0				
16	okt-1-en-3-yl acetát	1119	1110	1,0												

Tab. 3 Kvantifikace složek headspace zkoumaných genotypů máty s uvedenými retenčními indexy jednotlivých sloučenin. Genotypy: MPC = *M. piperita citrata*; ML = *M. longifolia*; MPI = *M. piperita*; MPU = *M. pulegium*; MSP = *M. spicata*; MC = *M. cervina*; MV = *M. villosa*; MA = *M. aquatica*; MPB = *M. piperita Bergamotova*; MAR = *M. arvensis*; MPP = *M. piperita Perpetua*; MM = *M. microphylla*; MSU = *M. suaveolens*. V tabulce jsou zvýrazněny vždy 3 majoritní složky headspace jednotlivých genotypů máty; majoritní složka headspace je vyznačena červenou barvou, 2. a 3. nejvíce zastoupené sloučeniny jsou vyznačeny zelenou a žlutou barvou (pokračování).

				<i>MPC</i>	<i>ML</i>	<i>MPI</i>	<i>MPU</i>	<i>MSP</i>	<i>MC</i>	<i>MV</i>	<i>MA</i>	<i>MPB</i>	<i>MAR</i>	<i>MPP</i>	<i>MM</i>	<i>MSU</i>
	Složka	RI	RI A.	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
17	oktan-3-yl acetát	1131	1120	2,0												
18	menthon	1160	1148			8,2	36,0		19,8		6,5			37,5		
19	menthofuran	1170	1159			10,3					24,4			24,8		
20	menthol	1179	1167	0,7												
21	isomenthol	1179	1180			15,4								5,5		
22	$\alpha$ -terpineol	1198	1186								0,2					
23	dihydrokarvon	1204	1200							2,7			1,2		5,8	
24	pulegon	1245	1233				48,2		13,9		0,3			2,1		
25	karvon	1250	1239							12,9			6,8		12,8	
26	piperiton	1260	1249						1,8							
27	linalyl acetát	1263	1254	29,5		2,6		3,4				49,6				4,8
28	mentyl acetát	1301	1294			2,1										
29	piperitenon	1347	1340						3,7							
30	$\alpha$ -terpineol acetát	1356	1346	2,6												
31	piperitenon oxid	1373	1366					6,1								15,2
	Celkem identifikováno (%)			100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Při identifikaci složek silic, jejich kvantifikaci a následné klasifikaci obsažených složek bylo zjištěno, že 12 ze 13 silic jednotlivých genotypů bylo majoritně složeno z oxidovaných monoterpenů. Klasifikací složek headspace byl zjištěno, že majoritně byly zastoupeny jednoduché i oxidované monoterpeny. Oxidované monoterpeny byly hlavní složkou 6 genotypů a jednoduché monoterpeny tvořily majoritně headspace 7 genotypů. Nejčastějšími složkami obsaženými v headspace, které byly klasifikovány jako oxidované monoterpeny, byly eukalyptol, menthon, menthofuran, pulegon, karvon a linalyl acetát. V headspace byl nejčastěji přítomen jednoduchý monoterpen limonen, který se vyskytoval u 12 genotypů a tvořil hlavní složku 5 genotypů. Dále byly přítomny jednoduché monoterpeny  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen a myrcen. Příkladem zastoupené aromatické látky byl *p*-cymen.

V headspace genotypů máty nebyly vůbec přítomné seskviterpeny ani jejich deriváty (například aldehydy či ketony). Tato skutečnost má jednoduché vysvětlení. Mezi významné terpeny zastoupené v rostlinách máty patří především monoterpeny a seskviterpeny. Jejich společnou vlastností je těkavost. Monoterpeny jsou vytvářeny ze dvou isoprenoidních jednotek (10 uhlíků), zatímco seskviterpeny jsou tvořeny třemi isoprenoidními jednotkami (15 uhlíky). Seskviterpeny se tedy vyznačují větší molekulovou hmotností, což způsobuje menší těkavost těchto látek (Jelen *et al.*, 1995). V silicích máty se vyskytovaly majoritně monoterpeny a jejich oxidované deriváty, zatímco množství seskviterpenů bylo nízké. V headspace, tedy v plynné fázi nad rostlinným materiálem, byly přítomny pouze vysoce těkavé monoterpeny, naopak méně těkavé seskviterpeny nepřešly ze vzorku do plynné fáze.

### 4.3 Kvantifikace fenolických látek

#### 4.3.1 Kvantifikace celkových fenolů

Celkový obsah fenolů v rostlinách máty byl stanoven Folin-Ciocalteuovou metodou s využitím methanolických extraktů máty. Nejprve byly vypočítány koncentrace původních extraktů máty ze vztahu:

$$c_{VZ} = \frac{\text{hmotnost rostlinného materiálu}}{\text{objem methanolu}} [g \cdot ml^{-1}]$$

Objem methanolu použitého pro extrakci byl 2 ml.



Jako standard byla využita kyselina gallová. Kalibrační řada pro spektrofotometrické měření sestávala ze 7 roztoků kyseliny gallové o různých koncentracích (25-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Byla sestavena kalibrační křivka kyseliny gallové (závislosti absorbance na koncentraci roztoku), jejíž předpis byl:

$$y = 0,0011x + 0,0172$$

$$R^2 = 0,9932$$

Množství celkových fenolů v extraktech bylo stanoveno jako ekvivalent kyseliny gallové odpovídající použitému množství extraktu. Následně byl tento obsah přepočítán na množství celkových fenolů v původní suché hmotě (DW). Byla změřena absorbance jednotlivých vzorků, měření probíhalo v triplicátech pro jednotlivé genotypy a hodnoty absorbance byly zaneseny do předpisu kalibrační křivky. Ekvivalent kyseliny gallové byl vypočítán následujícím způsobem:

$$y = 0,0011x + 0,0172$$

y...absorbance vzorku (A)

x ...ekvivalent kyseliny gallové odpovídající objemu daného vzorku ( $\text{GAE}_{\text{VZ}}$ )

$$\text{GAE}_{\text{VZ}} = (A - 0,0172)/0,0011 [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

Byl stanoven ekvivalent kyseliny gallové (GAE) odpovídající 1 g suché hmoty (DW) dle vztahu:

$$\text{GAE} = \frac{\text{GAE}_{\text{VZ}} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] * V_{\text{kys.gallové}} [\mu\text{l}]}{V_{\text{VZ}} [\mu\text{l}] * c_{\text{VZ}} [\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] * 1000} \quad [\text{mg ekv. kyseliny gallové na 1 g DW}]$$

Výsledky byly zaneseny do Tab. 4.

### 4.3.2 Kvantifikace flavonolů

Obsah flavonolů v rostlinách máty byl stanoven kolorimetrickou metodou s  $\text{AlCl}_3$  s využitím methanolických extraktů máty. Jako standard byl použit flavonol kvercetin. Kalibrační řada pro měření se skládala z 5 roztoků kvercetinu o různých koncentracích (1-50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Měřením závislosti absorbance roztoku na jeho koncentraci byla sestavena kalibrační křivka kvercetinu s následujícím předpisem:

$$y = 0,0237x + 0,0358$$

$$R^2 = 0,9932$$

Obsah flavonolů pro daný genotyp máty byl stanoven jako ekvivalent kvercetinu odpovídající použitému množství extraktu. Toto množství bylo posléze přepočítáno na obsah flavonolů v původní suché hmotě. Absorbance roztoků kvercetinu o různých koncentracích byla srovnávána s absorbancemi jednotlivých vzorků. Měření probíhalo pro každý genotyp v triplicátu. Ekvivalent kvercetinu byl vypočítán následujícím způsobem:

$$y = 0,0237x + 0,0358$$

y...absorbance vzorku (A)

x ...ekvivalent kvercetinu odpovídající použitému objemu daného vzorku ( $KVE_{VZ}$ )

$$KVE_{VZ} = (A - 0,0358)/0,0237 [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

Bylo vypočítáno množství kvercetinu v mg (ekvivalent kvercetinu; KVE) odpovídající 1 g suché hmoty (DW) a výsledky byly zaneseny do Tab. 4. Výpočet byl proveden dle vztahu:

$$KVE = \frac{KVE_{VZ}[\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] * V_{kvercetinu}[\mu\text{l}]}{V_{VZ}[\mu\text{l}] * c_{VZ}[\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] * 1000} [\text{mg ekv. kvercetinu na 1 g DW}]$$

### 4.3.3 Kvantifikace flavononů

Kvantifikace flavononů v extraktech máty byla provedena s využitím kolorimetrické metody s  $\text{AlCl}_3$ . Jako standard byl využit flavonon naringenin. Kalibrační řada byla tvořena 5 roztoky naringeninu o různých koncentracích (200-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Byla zjištěna závislost absorbance roztoku na jeho koncentraci. Kalibrační křivka kvercetinu měla následující předpis:

$$y = 0,0004x - 0,0046$$

$$R^2 = 0,9962$$

Pro každý genotyp byl stanoven obsah flavononů jako ekvivalent naringeninu odpovídající použitému množství extraktu, toto množství bylo následně přepočítáno na obsah flavononů v původní suché hmotě. Absorbance roztoků naringeninu o různých koncentracích byla srovnávána s absorbancemi jednotlivých vzorků. Měření probíhalo pro každý genotyp v triplikátu. Ekvivalent naringeninu byl pro použité množství extraktu vypočítán následujícím způsobem:

$$y = 0,0004x - 0,0046$$

y...absorbance vzorku (A)

x ...ekvivalent naringeninu odpovídající použitému objemu daného vzorku ( $NAE_{VZ}$ )

$$NAE_{VZ} = (A + 0,0046)/0,0004 [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$$

Poté bylo vypočítáno množství naringeninu v mg (ekvivalent naringeninu; NAE), které odpovídalo 1 g suché hmoty (DW) a výsledky byly zaneseny do Tab. 4. Výpočet byl proveden dle vztahu:

$$NAE = \frac{NAE_{VZ}[\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] * V_{naringeninu}[\mu\text{l}]}{V_{VZ}[\mu\text{l}] * c_{VZ}[\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] * 1000} \quad [\text{mg ekv. naringeninu na 1 g DW}]$$

Tab. 4 Kvantifikace celkových fenolů, flavonolů a flavononů v jednotlivých genotypech máty. Množství dané látky je vyjádřeno jako ekvivalent [mg] použitého standardu (GAE=kyseliny gallové, KVE= kvercetinů či NAE=naringeninu) odpovídající 1 g suché hmoty (DW). V tabulce jsou uvedeny průměrné koncentrace, měření probíhalo v triplikátech (n = 3). Zeleně jsou vyznačeny vždy 3 genotypy s nejvyšším obsahem celkových fenolů, flavonolů a flavononů.

Genotyp	Celkové fenoly		Flavonoly		Flavonony	
	mg GAE.g <sup>-1</sup> DW		mg KVE.g <sup>-1</sup> DW		mg NAE.g <sup>-1</sup> DW	
	Průměr	SD	Průměr	SD	Průměr	SD
<i>M.pip.citr.</i>	35,96	2,06	14,48	0,75	18,54	1,60
<i>M.longifolia</i>	37,38	2,52	16,83	1,45	8,70	2,58
<i>M.piperita</i>	49,89	5,43	14,12	1,55	29,40	2,78
<i>M.pulegium</i>	46,39	3,05	5,16	0,33	19,83	1,44
<i>M.spicata</i>	47,92	5,02	6,11	0,87	28,90	1,58
<i>M.cervina</i>	14,81	1,09	3,65	0,37	17,55	2,77
<i>M.villosa</i>	52,61	6,38	15,77	0,84	60,29	6,08
<i>M.aquatica</i>	43,32	3,19	14,42	1,34	52,21	5,73
<i>M.pip.Ber.</i>	51,97	3,26	14,42	0,97	39,44	5,07
<i>M.arvensis</i>	35,96	1,01	6,71	0,76	28,13	3,01
<i>M.pip.Per.</i>	29,07	4,35	5,90	0,44	17,67	1,61
<i>M.microp.</i>	40,26	4,14	5,47	0,76	19,43	2,86
<i>M.suaveol.</i>	58,93	8,39	8,28	0,62	19,26	3,21

Fenolické sloučeniny jsou zkoumány v bylinách zejména z toho důvodu, že často vykazují antioxidační aktivitu, jsou také nazývány přírodní antioxidanty. Mezi tyto látky patří zejména fenolické kyseliny a flavonoidy. Fenolické sloučeniny mají velký význam v potravinářském průmyslu, nejvíce jsou využívány druhy *M. piperita* a *M. spicata*. Byly vyhodnoceny výsledky kvantifikace celkových fenolů a flavonoidů (flavonolů a flavononů) v extraktech máty. Nejvyšší množství celkových fenolů bylo stanoveno v methanolickém extraktu genotypu *M. suaveolens* ( $58,93 \pm 8,39$  mg ekvivalentu kyseliny gallové (GAE).g<sup>-1</sup> suché hmoty (DW)). Vysoký obsah celkových fenolických látek byl také zjištěn u genotypů *M. villosa* ( $52,61 \pm 6,38$  mg GAE.g<sup>-1</sup> DW), *M. piperita* 'Bergamotova' ( $51,97 \pm 3,26$  mg GAE.g<sup>-1</sup> DW), *M. piperita* ( $49,89 \pm 5,43$  mg GAE.g<sup>-1</sup> DW) a *M. spicata* ( $47,92 \pm 5,02$  mg GAE.g<sup>-1</sup> DW). Nejnižší hodnoty byly získány u genotypu *M. cervina* ( $14,81 \pm 1,09$  mg GAE.g<sup>-1</sup> DW).

Nejvyšší obsah flavonolů byl zjištěn v genotypu *M. longifolia* ( $16,83 \pm 1,45$  mg ekvivalentu kvercetinu (KVE).g<sup>-1</sup> DW). Vysoké hodnoty byly stanoveny také u genotypů *M. villosa* ( $15,77 \pm 0,84$  mg KVE.g<sup>-1</sup> DW) a *M. piperita citrata* ( $14,48 \pm 0,75$  mg KVE.g<sup>-1</sup> DW). Genotyp *M. villosa* vykazoval nejvyšší množství flavononů ( $60,29 \pm 6,08$  mg ekvivalentu naringeninů (NAE).g<sup>-1</sup> DW). Nejnižší obsah flavononů byl zjištěn u genotypu *M. longifolia*.

Výsledky byly porovnány s literaturou. Pro kvantifikaci celkových fenolů, flavonolů a flavononů byly použity tři metody, které využívaly různé standardy. Množství jednotlivých stanovených látek v rostlinách, například obsah celkových fenolů a flavonolů, tedy nelze pro jednotlivé genotypy vzájemně porovnávat, jelikož ke kvantifikaci těchto látek byly použity ekvivalenty různých standardů. Z tohoto důvodu vykazují některé genotypy vyšší obsah flavonoidů než obsah celkových fenolů.

V řadě studií bylo zjištěno, že genotyp *M. suaveolens* vykazuje vysoký obsah fenolických látek (Mehrdad, 2016), což koreluje s výsledky práce – tento genotyp obsahoval nejvyšší množství celkových fenolů. Domácí genotyp *M. villosa* vykazoval nejvyšší obsah flavononů a druhý nejvyšší obsah flavonolů a celkových fenolů ze všech zkoumaných genotypů. Vysoký obsah těchto látek lze přičíst tomu, že tento genotyp je příbuzný *M. suaveolens*, vznikl křížením tohoto genotypu s *M. spicata*. V literatuře je také udáváno, že vysoké množství fenolů je obsaženo v rostlinách máty peprné a máty

klasnaté (*M. piperita* a *M. spicata*), což odpovídá výsledkům. Genotypy *M. piperita* a *M. piperita* 'Bergamotova' obsahovaly vysoké množství celkových fenolů, flavonolů i flavononů. Výjimkou byl domácí kultivar *M. piperita* cv. *Perpeta*. Tento genotyp vykazoval jedny z nejnižších obsahů celkových fenolů, flavonolů a flavononů. Genotyp *M. piperita* *citrata* obsahoval nižší množství celkových fenolů a flavononů, jedná se sice o genotyp vyšlechtěný z máty peprné, ale je příbuzný genotypu *M. aquatica*.

#### 4.4 Stanovení antioxidační aktivity extraktů a silic

Antioxidační aktivita extraktů a silic máty byla stanovena pomocí metody DPPH s využitím standardu troloxu. Kalibrační řada obsahovala 5 roztoků troloxu o koncentracích 0,01-0,1 mg.ml<sup>-1</sup>. Byla vypočtena antioxidační aktivita (AA) roztoků troloxu dle změny absorbance během 30 minut dle vzorce:

$$AA = [(A_0 - A_{30}) / A_0] * 100 [\%]$$

Byla sestavena kalibrační křivka závislosti antioxidační aktivity troloxu na jeho koncentraci, která měla následující předpis:

$$y = 358,62 x + 4,20$$

$$R^2 = 0,9982$$

Antioxidační aktivita extraktů a silic máty byla stanovena jako ekvivalent standardu troloxu. Pokles absorbance při použití extraktů či silic máty byl srovnán se změnou absorbance při použití antioxidantu troloxu. Z rovnice kalibrační křivky byla dle změny absorbance vzorku vypočítána koncentrace roztoku troloxu [mg ekv. troloxu.ml<sup>-1</sup>], které svými antioxidačními účinky odpovídalo použité množství extraktu či silice máty. V případě extraktů byla tato hodnota přepočítána na ekvivalent troloxu [mg] odpovídající 1 gramu suché hmoty (DW). Antioxidační aktivita silic byla vypočítána jako ekvivalent troloxu [mg] odpovídající 1 ml silice. Měření probíhalo v triplicátech pro jednotlivé genotypy a výsledkem byla průměrná hodnota koncentrace troloxu (mg ekv. troloxu.g<sup>-1</sup> DW či mg ekv. troloxu.ml<sup>-1</sup> silice). Výsledky byly zaneseny do Tab. 5 a Tab. 6 a byly porovnány s literaturou.

Tab. 5 Antioxidační aktivita methanolických extraktů máty, stanovená jako ekvivalent standardu troloxu odpovídající 1 g suché hmoty (DW). V tabulce je uvedena průměrná hodnota koncentrace, měření probíhalo v triplikátech. Zeleně jsou vyznačeny extrakty s nejvyšší a nejnižší antioxidační aktivitou.

Extrakty	Antioxidační aktivita			
	Genotyp	mg ekv. troloxu.g <sup>-1</sup> DW	SD	RSD (%)
	<i>M. villosa</i>	106,04	3,26	3,1
	<i>M. suaveolens</i>	91,65	2,92	3,2
	<i>M. longifolia</i>	91,01	8,95	9,8
	<i>M. piperita Bergamot.</i>	90,60	1,48	1,6
	<i>M. spicata</i>	88,96	10,38	11,7
	<i>M. piperita</i>	85,90	8,53	9,9
	<i>M. piperita citrata</i>	84,34	6,54	7,8
	<i>M. pulegium</i>	68,24	3,34	4,9
	<i>M. aquatica</i>	67,70	7,65	11,3
	<i>M. microphylla</i>	57,71	6,42	11,1
	<i>M. arvensis</i>	54,65	5,30	9,7
	<i>M. piperita Perpeta</i>	52,63	5,48	10,4
	<i>M. cervina</i>	22,79	1,85	8,1

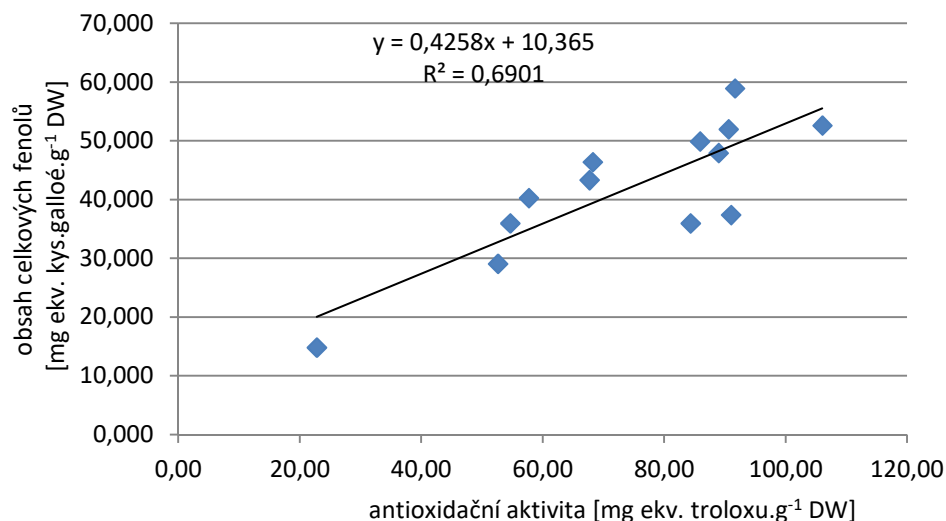
Tab. 6 Antioxidační aktivita silic máty, stanovená jako ekvivalent standardu troloxu odpovídající 1 ml silice. V tabulce je uvedena průměrná hodnota koncentrace, měření probíhalo v triplikátech. Zeleně jsou vyznačeny silice s nejvyšší a nejnižší antioxidační aktivitou.

Silice	Antioxidační aktivita			
	Genotyp	mg ekv. troloxu.ml <sup>-1</sup> silice	SD	RSD (%)
	<i>M. aquatica</i>	43,86	0,33	0,8
	<i>M. pulegium</i>	40,01	0,86	2,2
	<i>M. longifolia</i>	22,10	0,56	2,5
	<i>M. cervina</i>	20,96	0,19	0,9
	<i>M. spicata</i>	14,70	0,56	3,8
	<i>M. villosa</i>	8,01	0,74	9,3
	<i>M. arvensis</i>	7,83	0,21	2,7
	<i>M. microphylla</i>	7,28	0,10	1,4
	<i>M. suaveolens</i>	7,11	0,15	2,1
	<i>M. piperita Perpeta</i>	7,09	0,89	12,6
	<i>M. piperita Bergamot.</i>	4,56	0,73	15,9
	<i>M. piperita</i>	2,85	0,38	13,4
	<i>M. piperita citrata</i>	2,71	0,34	12,4

Nejprve byla zjišťována antioxidační aktivita methanolických extraktů máty, která byla následně přepočítána na množství troloxu odpovídající 1 g suché hmoty (DW). Extrakty všech genotypů máty vykazovaly schopnost donorů elektronů, byly tedy schopné redukce radikálů DPPH a jejich přeměny na neutrální produkty. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u genotypu *M. villosa* ( $106,04 \pm 3,26$  mg ekv. troloxu.g<sup>-1</sup> DW). Vyšší antioxidační aktivita extraktů byla zjištěna také u genotypů *M. suaveolens*, *M. longifolia* a *M. piperita Bergamotova* (více než 90,6 mg ekv. troloxu.g<sup>-1</sup> DW). Naopak nejnižší antioxidační aktivita byla stanovena u extraktu genotypu *M. cervina* ( $22,79 \pm 1,85$  mg ekv. troloxu.g<sup>-1</sup> DW).

Je udáváno, že fenolické sloučeniny obsažené v rostlinách odpovídají za jejich antioxidační vlastnosti (Farnad *et al.*, 2014; Dorman *et al.*, 2003). Antioxidační aktivita extraktů máty byla porovnána s výsledky kvantifikace fenolických sloučenin v jednotlivých genotypech. Nejvyšší obsah celkových fenolů byl stanoven u genotypů *M. suaveolens*, *M. villosa* a *M. piperita Bergamotova*, u těchto genotypů byla zjištěna také nejvyšší antioxidační aktivita. Zajímavým genotypem byl především *M. villosa*, který se vyznačoval nejvyšší antioxidační aktivitou a z předchozích výsledků je zřejmé, že tento genotyp obsahoval jak vysoké množství fenolů, tak i flavonolů a flavononů. Těchto vlastností je možné využít v potravinářství. Vysoká antiradikálová aktivita byla také stanovena pro genotyp *M. longifolia*, který obsahoval nejvyšší množství flavonolů ze všech genotypů. Genotyp *M. cervina* vykazoval nejnižší antioxidační aktivitu a obsahoval také nejnižší množství celkových fenolů.

Byl sestaven graf závislosti obsahu celkových fenolických sloučenin v jednotlivých genotypech máty na antioxidační aktivitě methanolických extraktů (Obr. 16). Byla dokázána korelace mezi obsahem celkových fenolů a antioxidační aktivitou rostlin máty. Za antioxidační aktivitu rostlin máty zodpovídají především fenolické kyseliny a flavonoidy. Příkladem fenolických kyselin obsažených v rostlinách máty mohou být kyselina kávová a její deriváty. Přírodními antioxidanty obsaženými v rostlinách a klasifikovanými jako flavonoidy mohou být kvercetin, myricetin a kamferol a jejich glykosidy (Kähkönen *et al.*, 1999).



Obr. 16 Závislost obsahu celkových fenolů v jednotlivých genotypech máty na jejich antioxidační aktivitě.

Stanovena byla také antioxidační aktivita silic jednotlivých genotypů máty. Silice všech genotypů vykazovaly antioxidační vlastnosti. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovala silice *M. aquatica* ( $43,86 \pm 0,33$  mg ekvivalentu troloxu.ml<sup>-1</sup>), vysokou antioxidační aktivitu měla také silice *M. pulegium* ( $40,01 \pm 0,86$  mg ekv. troloxu.ml<sup>-1</sup>). Nejnižší aktivita byla zjištěna u silice genotypu *M. piperita citrata* ( $2,71 \pm 0,34$  mg ekv. troloxu.ml<sup>-1</sup>). Výsledky stanovení aktivity byly porovnány s identifikací složek silic jednotlivých genotypů máty (viz. kapitola 4.1) a s literaturou.

Ve studiích je uváděno, že mezi složky silic s antioxidační schopností vyskytující se v rostlinách patří zejména thymol a karvakrol (Ćavar *et al.*, 2008). Thymol byl přítomen pouze v silici *M. longifolia* (19,5 %) a tato silice vykazovala vyšší antioxidační aktivitu ( $22,1 \pm 0,56$  mg ekv. troloxu.ml<sup>-1</sup>). Silice *M. aquatica*, která měla nejvyšší antioxidační aktivitu ze zkoumaných genotypů máty, byla majoritně složená z menthofuranu. Menthofuran je významným antioxidantem vyskytujícím se v rostlinách máty. Ve studiích bylo zjištěno, že tato látka vykazuje vyšší antioxidační schopnosti než  $\alpha$ -tokoferol (Racine a Auffray, 2005).

Majoritní složkou silice *M. pulegium* byl pulegon. V řadě studií byla zkoumána antioxidační aktivita silic máty. Bylo prokázáno, že silice majoritně tvořené pulegonem vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu (Meral *et al.*, 2002). Silice genotypů



*M. villosa*, *M. arvensis* a *M. microphylla* byly majoritně složené z karvonu a měly podobnou antioxidační aktivitu (7,28 – 8,01 mg ekv. troloxu.ml<sup>-1</sup> silice).

Volné radikály hrají významnou roli v oxidačním stresu, jehož důsledkem může být řada chorob, například ateroskleróza či některé neurodegenerativní poruchy. Antioxidanty mají schopnost tyto radikály eliminovat a redukovat tak oxidační stres. Extrakty i silice máty vykazovaly antioxidační schopnosti vůči DPPH radikálům. Tyto příznivé vlastnosti rostlin máty mohou být využívány například v potravinářském či farmaceutickém průmyslu. Antioxidanty jsou často využívány v potravinářském průmyslu jako konzervanty, ovšem studie dokazují, že syntetické antioxidanty mají řadu vedlejších účinků. Proto existuje snaha nahrazovat syntetické antioxidanty přírodními látkami s antioxidačními vlastnostmi (Dorman *et al.*, 2003).

#### **4.5 Stanovení antityrosinasové aktivity extraktů a silic**

Antityrosinasová aktivita extraktů a silic máty byla stanovena pomocí ekvivalentu standardu kyseliny kojové. Bylo připraveno 7 roztoků kyseliny kojové o koncentracích 0,005-0,1 mg.ml<sup>-1</sup>. Pro stanovení inhibiční aktivity byla zvolena logaritmická kalibrační křivka závislosti logaritmu absorbance roztoku na logaritmu koncentrace roztoku kyseliny kojové, jejíž předpis byl:

$$y = - 0,4672x - 1,8403$$

$$R^2 = 0,968$$

Byly změřeny absorbance roztoků při použití extraktů či silic, tyto hodnoty byly zlogaritmovány a následně dosazeny do předpisu kalibrační křivky za účelem získu logaritmické hodnoty koncentrace kyseliny kojové. Získané hodnoty byly odlogaritmovány a pro každý extrakt či silici byl získán ekvivalent kyseliny kojové [mg.ml<sup>-1</sup>], který odpovídal použitému objemu extraktu či silice. V případě extraktu bylo množství standardu přepočítáno na množství kyseliny kojové v µg odpovídající 1 g suché hmoty (DW). Antityrosinasová aktivita silice byla stanovena jako ekvivalent kyseliny kojové v mg odpovídající 1 ml silice. Výsledky byly zaneseny do Tab. 7 a Tab. 8 a byly porovnány s literaturou.

Tab. 7 Účinek extraktů máty na inhibici tyrosinasy, stanovený jako ekvivalent inhibitoru kyseliny kojové [μg] odpovídající 1 g suché hmoty (DW). V tabulce je uvedena průměrná hodnota koncentrace, měření probíhalo v triplikátech. Zeleně jsou vyznačeny extrakty s nejvyšší a nejnižší antityrosinásovou aktivitou.

Extrakty	Antityrosinásová aktivita		
Genotyp	μg ekv.kojové kyseliny.g <sup>-1</sup> DW	SD	RSD (%)
<i>M. pulegium</i>	123,89	5,64	4,55
<i>M. piperita</i>	102,82	15,16	14,74
<i>M. cervina</i>	91,77	6,11	6,66
<i>M. piperita Per.</i>	75,74	1,06	1,40
<i>M. spicata</i>	56,29	7,54	13,39
<i>M. longifolia</i>	50,36	6,70	13,30
<i>M. villosa</i>	49,83	6,12	12,29
<i>M. piperita citr.</i>	43,51	0,89	2,05
<i>M. suaveolens</i>	43,01	1,10	2,55
<i>M. arvensis</i>	41,60	0,003	6,27
<i>M. microphylla</i>	40,97	3,45	8,42
<i>M. aquatica</i>	38,45	1,75	4,54
<i>M. piperita Ber.</i>	36,11	6,47	17,91

Tab. 8 Účinek silic máty na inhibici tyrosinasy, stanovený jako ekvivalent inhibitoru kyseliny kojové [mg] odpovídající 1 ml silice. V tabulce je uvedena průměrná hodnota koncentrace, měření probíhalo v triplikátech. Zeleně jsou vyznačeny silice s nejvyšší a nejnižší antityrosinásovou aktivitou.

Silice	Antityrosinásová aktivita		
Genotyp	mg ekv. kojové kyseliny.ml <sup>-1</sup> silice	SD	RSD (%)
<i>M. piperita Ber.</i>	636,97	32,58	5,12
<i>M. pulegium</i>	403,19	55,93	13,87
<i>M. microphylla</i>	164,06	22,28	13,58
<i>M. piperita citr.</i>	120,58	19,40	16,09
<i>M. villosa</i>	75,63	9,95	13,15
<i>M. cervina</i>	56,61	7,21	12,73
<i>M. arvensis</i>	54,36	12,09	22,23
<i>M. piperita</i>	42,01	6,55	15,60
<i>M. suaveolens</i>	40,31	3,41	8,46
<i>M. piperita Per.</i>	26,87	7,54	28,07
<i>M. longifolia</i>	1,73	0,15	8,72
<i>M. aquatica</i>	1,42	0,19	13,55
<i>M. spicata</i>	1,33	0,21	15,71

Nejprve byl stanoven účinek methanolických extraktů máty na inhibici enzymu tyrosinasy. Extrakty všech genotypů vykazovaly mírnou antityrosinasovou aktivitu. Nejvyšší aktivita byla zjištěna u extraktu genotypu *M. pulegium* ( $123,89 \pm 5,64 \mu\text{g}$  ekvivalentu kyseliny kojové.g<sup>-1</sup> DW). Nejnižší antityrosinasová aktivita byla stanovena u extraktu *M. piperita Bergamotova* ( $36,11 \pm 6,47 \mu\text{g}$  ekv. kys. kojové.g<sup>-1</sup> DW). Výsledky byly porovnány s kvantifikací celkových fenolů v extraktech máty a se stanovením antioxidační aktivity. V literatuře je udáváno, že obsah celkových fenolických sloučenin v rostlinách, jejich antioxidační a antityrosinasová aktivita často korelují (Wang *et al.*, 2011). Porovnáním výsledků bylo zjištěno, že antioxidační aktivita extraktů máty byla přímo úměrná obsahu celkových fenolů, ale nebyla zjištěna korelace mezi obsahem celkových fenolů v extraktech máty a jejich antityrosinasovou aktivitou.

Byla stanovována také antityrosinasová aktivita silic máty. Silice všech genotypů vykazovaly antityrosinasovou aktivitu. Rozdíly mezi jednotlivými genotypy byly signifikantní. Nejvyšší antityrosinasovou aktivitu vykazovala silice *M. piperita Bergamotova* ( $636,97 \pm 32,58 \text{ mg}$  ekv. kys. kojové.ml<sup>-1</sup> silice). Účinek na inhibici tyrosinasy byl také vysoký u silice *M. pulegium* ( $403,19 \pm 55,93 \text{ mg}$  ekv. kys. kojové.ml<sup>-1</sup> silice). Nejnižší antityrosinasovou aktivitu měla silice *M. spicata* ( $1,33 \pm 0,21 \text{ mg}$  ekv. kys. kojové.ml<sup>-1</sup>). Výsledky byly porovnány se složením zkoumaných silic máty a také s literaturou.

Silice *M. piperita Bergamotova*, která měla nejvyšší antityrosinasovou aktivitu, byla majoritně složená z monoterpenu linaloolu (45,9 %). Ve studiích bylo prokázáno, že silice bohaté na linalool mají často vysokou enzymovou inhibiční aktivitu (Souza *et al.*, 2012). Tento účinek může být vysvětlen chelatačními vlastnostmi linaloolu. Tyrosinasa je enzym obsahující dva atomy mědi. Podstatou inhibičního účinku látek vůči tyrosinase je chelatace mědi v aktivním místě enzymu, což vede k ireverzibilní inaktivaci enzymu (Kim a Uyama, 2005). Inhibitory tyrosinasy jsou například kvercetin či kamferol. Linalool má významné chelatační vlastnosti a je schopen inhibovat tyrosinasu stejným způsobem jako tyto látky. Linalool byl také majoritní složkou silice *M. piperita citrata* (33 %), která vykazovala vyšší inhibiční aktivitu ( $120,58 \pm 19,40 \text{ mg}$  ekv. kys. kojové.ml<sup>-1</sup>).

Tyrosinasa je významným enzymem v biosyntéze pigmentu melaninu. Melanin zodpovídá za ochranu kůže před škodlivým UV zářením. Velký význam mají inhibitory tyrosinasy. Jejich nejdůležitějším možným použitím je odvětví medicíny. Tyto látky jsou používány zejména při léčbě hyperpigmentace kůže. Významné jsou také pro potravinářský průmysl. Tvorba melaninu zodpovídá za vznik hnědých skvrn na ovoci a látky s inhibiční schopností jsou používány pro zabránění hnědnutí. V poslední době jsou také tyto inhibitory využívány k výrobě kosmetických produktů bělících kůži (Kadekaro *et al.*, 2003).

## 5 ZÁVĚR

Byla zpracována teoretická část práce, která se věnuje rodu máty a vybraným genotypům máty, sekundárním metabolitům rostlin a způsobům charakterizace přírodních produktů. Teoretická část práce byla zaměřena na sekundární metabolity vyskytující se v mátě. Byly popsány metody izolace sekundárních metabolitů máty a metody jejich analýzy.

Experimentální část je věnována analýze vybraných genotypů máty. S využitím techniky GC-MS byla provedena kvantifikace složek silic vybraných genotypů máty, kvantifikace složek headspace a výsledky byly srovnány s literaturou. Cílem bylo srovnat 13 genotypů na základě složení silic a headspace. V silicích máty bylo identifikováno celkem 64 sloučenin. S výjimkou genotypu *M. longifolia* byly silice složené majoritně z oxidovaných derivátů monoterpenů (tvořily více než 60 % složení silic), v menší míře byly přítomny seskviterpeny. Silice *M. longifolia* byla složená z aromatických sloučenin (30,8 %), oxidovaných (30,8 %) a jednoduchých monoterpenů (29,1 %). Nejčastěji zastoupenými majoritními složkami silic jednotlivých genotypů byly oxidované monoterpeny eukalyptol, menthon, menthofuran, pulegon a karvon. V headspace zkoumaných genotypů bylo identifikováno 31 složek.

Dalším z cílů bylo stanovit obsah celkových fenolů, flavonolů a flavononů v extraktech máty a porovnat obsah těchto látek v jednotlivých genotypech. Nejvyšší množství celkových fenolů bylo zjištěno v extraktu genotypu *M. suaveolens* ( $58,93 \pm 8,39$  mg GAE.g<sup>-1</sup> DW). Nejvyšší obsah flavonolů byl zjištěn u genotypu *M. longifolia* ( $16,83 \pm 1,45$  mg KVE. g<sup>-1</sup> DW). Z hlediska obsahu fenolických látek je zajímavý především genotyp *M. villosa*, který měl vysoký obsah celkových fenolů, flavonolů a nejvyšší obsah flavononů ( $60,29 \pm 6,08$  mg NAE.g<sup>-1</sup> DW).

Dále byla stanovována antioxidační aktivita extraktů a silic máty. Antioxidanty hrají významnou roli v redukci oxidačního stresu. Cílem stanovení bylo odhalit potenciální antioxidační schopnost genotypů máty. Byla zjištěna korelace mezi antioxidační aktivitou extraktů a obsahem celkových fenolů v jednotlivých genotypech máty - vysoký obsah fenolických látek je přímo úměrný antioxidační aktivitě methanolických extraktů. Nejvyšší antioxidační aktivita extraktu byla zjištěna u genotypu *M. villosa* ( $106,04 \pm 3,26$  mg ekv. troloxu.g<sup>-1</sup> DW), tento genotyp měl také vysoký obsah fenolických látek. Těchto skutečností lze využít v komerční sféře, extrakt by mohl

sloužit jako zdroj polyfenolických látek či antioxidant v potravinářství. Silice *M. aquatica* vykazovala nejvyšší antioxidační aktivitu ( $43,86 \pm 0,33$  mg ekv. troloxu.ml<sup>-1</sup>). Majoritní složkou silice byl menthofuran, látka s významnými antioxidačními účinky.

Posledním z cílů bylo stanovit enzymovou inhibiční aktivitu genotypů máty. Tyrosinasa je významným enzymem ovlivňujícím biosyntézu pigmentu melaninu. Syntetické inhibitory tyrosinasy mají velký význam, jsou používány zejména v medicíně k léčbě hyperpigmentace kůže. Dále jsou také využívány v potravinářském průmyslu, působí proti hnědnutí ovoce a zeleniny, ale mají pouze omezené využití z důvodů alergenních účinků. Je prováděna řada studií zkoumajících antityrosinase vlastnosti přírodních látek s cílem využití těchto látek v medicíně a v průmyslu. Byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi aktivitou silic a extraktů jednotlivých genotypů. V případě hodnocení extraktu měl nejvyšší aktivitu genotyp *M. pulegium* ( $123,89 \pm 5,64$  μg ekv. kys. kojové.g<sup>-1</sup>DW), v případě silice *M. piperita* 'Bergamotova' ( $636,97 \pm 32,58$  mg ekv. kys. kojové.ml<sup>-1</sup>). Nebyla zjištěna korelace mezi antityrosinase aktivitou extraktů máty a obsahem fenolů. Majoritní složkou silice *M. piperita*, 'Bergamotova' byl linalool, který má chelatační účinky a je tudíž schopen inhibovat tyrosinase. Tento efekt lze komerčně využít k produkci přípravků s léčivým účinkem zaměřených na regulaci pigmentace a v potravinářství.

Výsledky dokládají všestranné použití rostlin a produktů rodu *Mentha*. Mezi multifunkční genotypy patří *M. villosa*, kvůli své citronově vonící silici, vysokému obsahu fenolických látek a vysoké antioxidační aktivitě. Z pěstitelského hlediska je tento genotyp také výhodný, dobře se množí, v podmínkách ČR dobře přezimuje, vzhledem ke svým chlupatým listům je neatraktivní pro škůdce a netrpí téměř žádnými chorobami.

## 6 LITERATURA

- Adams R.P. (2007): *Identification of Essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4th ed., Allured Publishing Corporation, USA, 804 stran.
- Babushok V.I., Linstrom P.J., Zenkevich I.G. (2011): Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *The Journal of Physical Chemistry* **40**, 1–47.
- Bahl J.R., Bansal R.P., Garg S.N., Naqvi A., Luthra R., Kukreja A.K., Kumar S. (2000): Quality evaluation of the essential oils of the prevalent cultivars of commercial mint species *Mentha arvensis*, *spicata*, *cardiaca*, *citrata* and *viridis* cultivated in Indo-Gangetic plains. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* **22**, 787–797.
- Baser K., Buchbauer G. (2016): *Handbook of Essential oils: Science, Technology and Applications*. 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1112 stran.
- Baser K.H.C., Kürkcüoglu M., Tarimcilar G., Kaynak G. (1999): Essential oils of *Mentha* species from northern Turkey. *J. Essent. Oil Res.* **11**, 579-588.
- Bhowal M., Gopal M. (2016): Eucalyptol: Safety and pharmacological profile. *RGUHS J Pharm Sci* **5**, 125-131.
- Bimakr M., Rahman R.A., Taip F.S., Ganjloo A., Selamat J., Hamid A.A., Sarker M.Z.I. (2011): Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*M. spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing* **89**, 67-72.
- Blois M.S. (1958): Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. (1997): Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Science and Technology* **30**, 609–615.
- Brahmi F., Khodir M., Mohamed C., Pierre D. (2017): Chemical Composition and Biological Activities of *Mentha* Species. In: *Aromatic and medicinal plants – Back to nature*. (El-Shemy H.A. ed.), Cairo, Egypt, 47-79.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* **28**, 25–30.
- Capecka E., Mareczek A., Leja M. (2005): Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food chemistry* **93**, 223-226.
- Ćavar S., Maksimović M., Šolić M.E., Jerković-Mujkić A., Bešta R. (2008): Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food chemistry* **111**, 648-653.
- Celenk S., Tarimcilar G., Bicakci A., Kaynak G., Malyer H. (2008): A palynological study of the genus *Mentha* L. (*Lamiaceae*). *Botanical journal of the linnean society* **157**, 141-154.
- Chalkos D., Kadoglidou K., Karamanoli K., Fotiou C., Pavlatou-Ve A., Eleftherohorinos I., Constantinidou H.A., Vokou D. (2010): *Mentha spicata* and *Salvia fruticosa* composts as soil amendments in tomato cultivation. *Plant and soil* **332**, 495-509.
- Chang T.S. (2009): An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 2440-2475.

- Chauhan R.S., Kaul M.K., Shahi A.K., Kumar A., Ram G., Tawa A. (2009): Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial Crops and Products* **29**, 654–656.
- Chen Q.X., Liu X.D., Huang H. (2003): Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution. *Biochemistry (Moscow)* **68**, 644-649.
- Coleman W.K., Lonergan G., Silk P. (2001): Potato sprout growth suppression by menthone and neomenthol, volatile oil components of *Minthostachys*, *Satureja*, *Bystropogon*, and *Mentha* species. *American Journal of Potato Research* **78**, 345-354.
- Dorman H.J.D., Kosar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen H. (2003): Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties and Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4563-4569.
- Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. (2004): Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol* **135**, 1893–1902.
- Farnad N., Heidari R., Aslanipour B. (2014): Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*). *Journal of Food Measurement and Characterization* **8**, 113-121.
- Fialová S., Tekelová D., Švajdlenka E., Potůček P., Jakubová K., Grančai D. (2014): The variability of secondary metabolites in *Mentha x piperita* cv. 'Perpeta' during the development of inflorescence. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* **2**, 21-25.
- Fleisher A., Fleisher Z. (1998): Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part XII. Volatile extract of *Mentha longifolia* growing in Israel. *J. Essent. Oil Res.* **10**, 647-648.
- Galuszka P., Luhová L. (2005): *Laboratorní technika pro biochemiky*. 2. vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika, 111 stran.
- Gavalas M., Bosabalidis A.M., Kokkini S. (1998): Comparative study of leaf anatomy and essential oils of the hybrid *Mentha x villosa-nervata* and its parental species *M. longifolia* and *M. spicata*. *Israel J. Plant Sci.* **46**, 27-33.
- Golden G., Quinn E., Shaaya E., Kostyukovsky M., Poverenov E. (2018): Coarse and nano emulsions for effective delivery of the natural pest control agent pulegone for stored grain protection. *Pest Management Science* **74**, 820-827.
- Gomez C.A., da Cruz T.G., Andrade J.L., Milhazes N., Borges F., Marques M.P. (2003): Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *Journal of Medicinal Chemistry* **6**, 5395-5401.
- Greggio E., Bergantino E., Carter D., Ahmad R., Costin G.E., Hearing V.J., Clarimon J., Singleton A., Eerola J., Hellstrom O., Tienari P.J., Miller D.W., Beilina A., Bubacco L., Cookson M.R. (2005): Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* **93**, 246-256.
- Gupta A., Naraniwal M., Kothari V. (2012): Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences* **1**, 8-26.
- Hajlaoui H., Snoussi M., Noumi E., Zanetti S., Ksouri R., Bakhrouf A. (2010): Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of five Tunisian aromatic plants. *Italian Journal of Food Science* **22**, 320–329.



- Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (2008): *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. 1st ed, ICS-UNIDO, Terst, Italy, 260 stran.
- Hawryl M.A., Skalicka-Wozniak K., Swieboda R., Niemiec M., Stepak K., Waksmundza-Hajnos M., Hawryl A., Szymczak G. (2015): GC-MS fingerprints of mint Essential oils. *Open chemistry* **13**, 1326-1332.
- Heldt H.W. (2005): *Plant biochemistry*. 3rd ed., Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, 630 stran.
- Jelen H.H., Mirocha C.J., Wasowicz E., Kaminski E. (1995): Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3815-3820.
- Kadekaro A., Kanto H., Kavanagh R., Abdel-Malek Z. (2003): Significance of melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences* **994**, 359-366.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999): Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3954-3962.
- Kim Y.J., Uyama H. (2005): Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol. Life Sci* **62**, 1707-1723.
- Kim Y.W., Kim M.J., Chung B.Y. (2013): Safety Evaluation and Risk Assessment of d-limonene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* **16**, 17-38.
- Koyalta D., Sanaokko A., Miralles J., Bassene E. (1993): Etude des huiles essentielles de trois especes de Menthe acclimates au Senegal. *Rivista Ital. Numero speciale*, 544-547.
- Kumar P., Mishra S., Malik A., Satya S. (2011): Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products* **34**, 802-817.
- Lawrence B.M. (1978): *A study of the monoterpene interrelationships in the genus Mentha with special reference to the origin of pulegone and menthofuran*. PhD. Thesis, State University, Groningen, Netherlands.
- Lawrence B.M. (2007): Oil composition of Other *Mentha* species and Hybrids. In: *Mint: The genus Mentha*. (Lawrence B.M. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 325-346.
- Lincoln D.E., Murray M.J., Lawrence B.M. (1986): Chemical composition and genetic basis for the isopinocampone chemotype of *Mentha citrata* hybrids. *Phytochemistry* **25**, 1857-1863.
- Maffei M., Berteza C.M., Mucciarelli M. (2007): Anatomy, Physiology, Biosynthesis, Molecular Biology, Tissue Culture, and Biotechnology of Mint Essential Oil Production. In: *Mint: The genus Mentha*. (Lawrence B.M. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 42-77.
- Macholán L. (2003): *Sekundární metabolity*. 2. vydání, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, Česká republika, 150 stran.
- Malingré T.M. (1969): Gas chromatographic investigation of the essential oil of *Mentha piperita* during development of the plant. *Pharm. Weekbl.* **104**, 381-406.
- Malizia R.A., Molli J.S., Cardell D.A., Retamar J.A. (1996): Essential oil of *Mentha citrata* grown in Argentina. Variation in the composition and yield at full- and post- flowering. *J. Essent. Oil Res.* **8**, 347-349.

- Mehrdad A., Javad K., Mahdi K., Farhad A., Mahnaz A. (2016): Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M. longifolia* accessions. *Annals of Agricultural Science* **61**, 175-179.
- Mellon F.A. (2003): Combined Chromatography and Mass Spectrometry. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. (Caballero B. ed.), Academic press, USA, 1294-1301.
- Meral G.E., Konyalioglu S., Ozturk B. (2002): Essential oil composition and antioxidant activity of endemic *Ziziphora taurica* subsp. *cleonioides*. *Fitoterapia* **73**, 716-718.
- Miguel M., Barros L., Pereira C., Calhelha R.C., Garcia P.A., Castro M., Santos-Buelga C., Ferreira I.C. (2016): Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves). *Food&Function* **7**, 2223-2232.
- Nagy M., Grančai D. (1996): Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie* **51**, 100-101.
- Nagy M., Grančai D., Mučaji P. (2011): *Farmakognózia: Biogenéza prírodných látok*. 1. vydání, Vydavateľstvo Osveta, Martin, Slovenská republika, 238 stran.
- Paulová H., Bochořáková H., Táborská E. (2004): Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy* **98**, 174-179.
- Poppenga R.H., Oehme F.W. (2010): Pesticide Use and Associated Morbidity and Mortality in Veterinary Medicine. In: *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Krieger R. ed.), Elsevier, Nizozemí, 285-301.
- Racine P., Auffray B. (2005): Quenching of singlet molecular oxygen by *Commiphora myrrha* extracts and menthofuran. *Fitoterapia* **76**, 316-323.
- Reeve R.N. (1994): *Environmental analysis: Analytical chemistry by open learning*. 1st ed., John Wiley&Sons, New york, USA, 284 stran.
- Saghaie L., Pourfarzam M., Fassihi A., Sartippour B. (2013): Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. *Research in Pharmaceutical Sciences* **8**, 233-242.
- Salvador A., Chisvert A. (2017): *Analysis of cosmetic products*. 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 630 stran.
- Shaikh S., Yaacob B.H., Rahim H.A.Z. (2014): Prospective role in treatment of major illnesses and potential benefits as a safe insecticide and natural food preservative of mint (*Mentha spp.*): a Review. *Asian J Biomed Pharm Sci*. **4**, 1-12.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **16**, 144-158.
- Soilhi Z., Rhimi A., Heuskin S., Fauconnier M.L., Mekki M. (2019): Essential oil chemical diversity of Tunisian *Mentha spp.* collection. *Industrial Crops and & Products* **131**, 330-340.
- Souza P.M., Elias S.T., Simeoni L.A., de Paula J.E., Gomes S.M., Guerra E.N.S., Fonseca Y.M., Silva E.C., Silveira D., Magalhaes P.O. (2012): Plants from Brazilian Cerrado with potent Tyrosinase inhibitory activity. *PLoS One* **7**, 1-7.
- Spilková J., Martin J., Siatka T., Tumová L., Kašparová M. (2016): *Farmakognozie*. 1. vydání, Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, Česká republika, 348 stran.

- Struchkov P., Beloborodov V., Kolkhir V., Voskoboynikova I., Savvateev A. (2018): Comparison of spectrophotometric methods of total flavonoid assay based on complex formation with aluminum chloride as applied to multicomponent herbal drug angionorm. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **9**, 1-7.
- Therdthai N., Zhou W. (1994): Characterization of microwave vacuum drying and hot air drying of mint leaves (*Mentha cordifolia Opiz ex Fresen*). *J Food Eng* **91**, 482–489.
- Tiwari P. (2016): Recent advances and challenges in trichome research and essential oil biosynthesis in *Mentha arvensis* L. *Industrial Crops and Prod.* **82**, 141-148.
- Tomita K., Oda N., Ohbayashi M., Kamei H., Miyaki T., Oki T. (1990): A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *The journal of antibiotics* **18**, 1601-1605.
- Vaverková Š., Mistríková I., Hollá M. (2009): Qualitative properties of *Mentha x piperita* (L.) after application of the fungicide Hattrick DP-50. *Plant, Soil and Environment* **55**, 454-459.
- Velišek J., Hajšlová J. (2009): *Chemie potravin 2. 3. vydání*, Nakladatel OSSIS, Tábor, Česká republika, 623 stran.
- Wang C., Ng C., Lin H., Shyu T. (2011): Free radical-scavenging and tyrosinase-inhibiting activities of extracts from sirghum distillery residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **111**, 554-556.
- Wardencki W. (2000): Sulfur compounds: Gas chromatography. In: *Encyclopedia of Separation Science*. (Cooke M. ed.), Academic press, USA, 4285-4301.
- Waterhouse A.L. (2003): Determination of total phenolics. *Current PProtocols in Food Analytical Chemistry* **6**, II.1.1-II.1.8.
- Wells D.A. (2000): Bioanalytical applications: Solid phase extraction. In: *Encyclopedia of Separation Science*. (Cooke M. ed.), Academic press, USA, 2142-2146.
- Woisky R., Salatino A. (1998): Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* **37**, 99-105.
- Zhang Q.-W., Lin L.-G., Ye W.-C. (2018): Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive reviews. *Chinese Medicine*, **13**:20. <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13020-018-0177-x>

Cítace internetového zdroje:

<http://medilabexports.com/> Laboratorní technika a chemické potřeby; navštíveno dne 9.4.2019.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-DNPH	-	2,4-dinitrofenylhydrazin
AAPH	-	2,2'-azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
ABTS	-	2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
DMAPP	-	dimethylalylldifosfát
DMSO	-	dimethylsulfoxid
DPPH	-	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DW	-	angl. dry weight (suchá hmota)
GAE	-	ekvivalent kyseliny gallové
GC-FID	-	plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (angl. GC – Flame Ionization Detector)
GC-MS	-	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (angl. Gas chromatography – Mass spectrometry)
GPP	-	geranyldifosfát
IPP	-	isopentenyldifosfát
KVE	-	ekvivalent kvercetinu
L-DOPA	-	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
LPP	-	linalyldifosfát
NAE	-	ekvivalent naringeninů
NOS	-	reaktivní formy dusíku (angl. reactive nitrogen species)
ORAC	-	angl. oxygen radical absorbance capacity
RI	-	retenční index
ROS	-	reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species)
SPE	-	angl. solid phase extraction
TPP	-	thiamindifosfát